

Multivalente Kohlenhydrat-PNA-DNA-Konjugate zur Charakterisierung von Hämagglutininen und Entwicklung hochpotenter Inhibitoren von Influenza-Viren

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Victor Bandlow

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Oliver Seitz
2. Prof. Dr. Christoph Arenz
3. Prof. Dr. Valentin Wittmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2021

Kurzzusammenfassung

Das Prinzip der Multivalenz ist in der Natur allgegenwärtig, welches auch von Influenza-Viren genutzt wird, um über ihre Oberflächenproteine an epitheliale Wirtszellen zu binden. Diese Interaktion bietet einen interessanten Ansatzpunkt für multivalente Inhibitoren, wenn es gelingt, die Bedingungen für eine effiziente Wechselwirkung mit dem Virus zu entschlüsseln. Hierzu wurde in dieser Arbeit eine Charakterisierung des Hämagglutinin-Trimers (HA) auf viralen Partikeln mittels Kohlenhydrat-Nukleinsäuregerüsten und Kohlenhydrat-Polyethylenglykol (PEG)-Gerüsten vorgenommen. Distanz-Affinitäts-Beziehungen für die Interaktion des trimeren HA mit den bivalenten Präsentationen des Sialyl-LacNAc zeigten, dass bivalente PEG-Konjugate nicht in der Lage sind, eine bivalente Verstärkung der Wechselwirkungen mit der löslichen HA-Ektodomäne oder mit HA auf der viralen Oberfläche herbeizuführen, wobei die räumliche die Rasterung mit PNA-DNA-Gerüsten eine bimodale Distanz-Affinitäts-Beziehung ergab. Ein Affinitätsmaximum in einem Abstand von 52 - 59 Å wurde einer simultanen Bindung an zwei kanonische Bindungsstellen eines HA-Trimers zugeordnet, wobei ein zweites Affinitätsmaximum bei 26 Å auf die Existenz einer sekundären Bindungsstelle hindeutet. In dieser Arbeit wurde erstmals die multivalente Präsentation von Glykoliganden auf langen repetitiven DNA-Templaten demonstriert. Es wurden Nukleinsäure-Komplexe erhalten die eine vollständige Inhibierung der Virus-induzierten Hämagglutination bei einer Konzentration von 10^{-9} M des Templats erzielten, was einer 10^7 -fachen Verstärkung bezogen auf den monovalenten Zucker entspricht. Neben einer hochpotenten Inhibition offenbarten distanzoptimierte bivalente und multivalente Binder auf Nukleinsäuregerüsten auch subtypspezifische Inhibition.

Abstract

The principle of multivalency is omnipresent in nature, which is also used by influenza viruses to bind to epithelial host cells via their surface proteins. This interaction offers an interesting starting point for multivalent inhibitors if the conditions for an efficient interaction with the virus can be deciphered. For this purpose, the hemagglutinin trimer (HA) on viral particles was characterized using carbohydrate-nucleic acid scaffolds and carbohydrate-polyethylene glycol (PEG) scaffolds. Distance-affinity relationships for the interaction of the trimeric HA with the bivalent presentations of the sialyl-LacNAc showed that bivalent PEG conjugates are not capable of a bivalent enhancement of the interactions with the soluble HA ectodomain or with HA on the viral surface, whereby the spatial screening with PNA-DNA scaffolds resulted in a bimodal distance-affinity relationship. An affinity maximum at a distance of 52 - 59 Å was assigned to simultaneous binding to two canonical binding sites of an HA trimer, with a second affinity maximum at 26 Å indicating the existence of a secondary binding site. In this work the multivalent presentation of carbohydrate ligands on long repetitive DNA templates was demonstrated for the first time. Nucleic acid complexes were obtained which achieved a full inhibition of the virus-induced hemagglutination at a concentration of 10^{-9} M of the template, which corresponds to a 10^7 -fold increase in relation to the monovalent sugar. In addition to a highly potent inhibition, distance-optimized bivalent and multivalent binders on nucleic acid structures also revealed subtype-specific inhibition.

Die experimentellen Arbeiten wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Oliver Seitz am Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Februar 2013 bis Juni 2018 angefertigt.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen.....	2
2.1 Multivalente Wechselwirkungen und deren Charakterisierung.....	2
2.2 Influenza-Virus und antivirale Strategien.....	7
2.2.1 Virusstruktur und Replikationsmechanismus.....	7
2.2.2 Antivirale Strategien.....	9
2.2.3 Multivalente Glykokonjugate für das virale Hämagglutinin	10
2.3 Nukleinsäure-Gerüste als multivalente Binder.....	13
3. Zielsetzung.....	20
4. Ergebnisse und Diskussion.....	23
4.1 Entwicklung molekularer Lineale für das virale Hämagglutinin auf Basis von PNA·DNA- und Polyethylenglykol-Gerüsten	23
4.1.1 Synthese des Sialyl-LacNAc-Liganden.....	24
4.1.2 Herstellung von Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexen	28
4.1.2.1 Automatisierte Festphasensynthese von PNA-Oligomeren	28
4.1.2.2 Synthese von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten.....	30
4.1.2.3 Herstellung und Charakterisierung von Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexen	31
4.1.3 Synthese von Sialyl-LacNAc-Polyethylenglykol-Konjugaten.....	33
4.2 Untersuchung der Wechselwirkungen von Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Duplexen und Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugaten mit Hämagglutininen auf viralen Partikeln	37
4.2.1 Räumliche Rasterung von löslichen Hämagglutinin-Trimeren	37
4.2.2 Analyse der bivalenten Wechselwirkungen mit löslichen Hämagglutinin-Trimeren mit Modellen der statistischen Mechanik	40
4.2.3 Räumliche Rasterung von Hämagglutinin auf viralen Influenza-Partikeln in der mikroskaligen Thermophorese.....	44
4.2.4 Räumliche Rasterung von Hämagglutinin auf der viralen Oberfläche im Hämagglutinationstest.....	49
4.2.5 Einfluss erweiterter Gerüstflexibilität auf ausgewählte bivalente PNA·DNA-Komplexe.....	52
4.3 Räumliche Rasterung von löslichen Hämagglutinin-Trimeren mit PeB-PNA·DNA-Komplexen in der mikroskaligen Thermophorese.....	54
4.4 Multivalente Präsentation bivalenter Binder	58
4.4.1 DNA-Drei-Wege-Kreuzung.....	58
4.4.2 Lineare und verzweigte multivalente PNA·DNA-Komplexe auf DNA-Concatemeren.....	61
4.4.2.1 Generierung und Charakterisierung der DNA-Concatemere.....	61
4.4.2.2 Lineare und verzweigte Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexe auf RCA-Produkten.....	65

4.4.2.3	Untersuchung der Wechselwirkungen linearer und verzweigter Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe mit Influenza A-Viren	68
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	78
5.1	Zusammenfassung.....	78
5.2	Ausblick.....	84
6.	Experimenteller Teil	85
6.1	Geräte und Materialien	85
6.1.1	Lösungsmittel und Reagenzien	85
6.1.2	Chromatographische Methoden	86
6.1.3	Massenspektrometrie	87
6.1.4	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)	87
6.1.5	UV/Vis-Spektroskopie	87
6.1.6	Fluoreszenzmessungen am Plattenlesegerät.....	87
6.1.7	Denaturierungsexperimente.....	88
6.1.8	Gelelektrophorese	88
6.2	Synthesevorschriften	91
6.2.1	Synthese von Maleimido-Sialyl-LacNAc	91
6.2.2	Synthese von Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugaten	92
6.2.2.1	Synthese von <i>S</i> -Tritylthiopropyl- <i>N</i> -[(1-thyminyl)-acetyl]-glycin.....	92
6.2.2.2	Synthese bivalenter Sialyl-LacNAc-Polyethylenglykol (PEG)-Konjugate	95
6.2.2.3	Synthese monovalenter Sialyl-LacNAc-Polyethylenglykol (PEG)-Konjugate	99
6.2.3	Synthese von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten.....	102
6.2.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Synthese von PNA-Oligomeren	102
6.2.3.2	Protokoll zur automatisierten Festphasen-PNA-Synthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie	102
6.2.3.3	Ligation von Maleimido-Sialyl-LacNAc an PNA-Konjugate	106
6.2.4	Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten.....	109
6.2.4.1	Protokoll zur automatisierten Festphasenpeptidsynthese	109
6.2.4.2	Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten.....	112
6.2.5	Synthese von DNA-Concatemeren.....	115
6.2.5.1	Zyklisierung linearer DNA-Sequenzen.....	115
6.2.5.2	<i>Rolling Circle Amplification (RCA)</i> zirkulärer DNA-Sequenzen	116
6.2.5.3	Enzymatischer Verdau eines RCA-Concatemers	118
6.3	Zusammensetzung der hergestellten Kohlenhydrat-PNA- und Peptid-PNA-DNA-Komplexe.....	119
6.4	Hämagglutinationstest und Mikroskalige Thermophorese	123
6.5	Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie	126
7.	Literaturverzeichnis.....	127
8.	Anhang.....	134
8.1	UPLC-Chromatogramme und ESI-MS-Spektren.....	134
8.2	NMR-Spektren.....	135
8.3	Abkürzungsverzeichnis	146
	Danksagung	149
	Selbstständigkeitserklärung.....	150

1. Einleitung

Die extrazelluläre Oberfläche von Zellen ist mit einer dichten Schicht von komplexen Kohlenhydraten, der Glykokalyx, bedeckt. Diese ist ein bedeutender Akteur bei der zellulären Erkennung und ist in viele biologische Prozesse, wie zum Beispiel der Adhäsion von Pathogenen an Wirtszellen, der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe oder der Metastasierung von Krebszellen, involviert.^[1-3] Den Prozessen liegen multiple Wechselwirkungen von Kohlenhydraten und kohlenhydratbindenden Proteinen (Lektine) zugrunde. Jede einzelne dieser Wechselwirkungen ist in der Regel von sehr schwacher, nicht-kovalenter Natur, doch in ihrer Summe resultieren hochaffine und selektive Interaktionen.

Der multivalente Charakter dieser Interaktionen wurde erst in den 1970er Jahren erkannt.^[4-7] Seitdem besteht reges Interesse diese Prozesse mittels multivalenter Werkzeuge zu manipulieren, Struktur-Funktionsuntersuchungen durchzuführen oder besonders affine multivalente Verbindungen als potentielle Therapeutika zu entwickeln. Dies führte zur chemischen Synthese diverser multivalenter Glykomimetika, -dendrimere und -polymere mit beeindruckenden Eigenschaften.^[3, 8-13] Eine systematische Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Prozesse ist jedoch, aufgrund der hohen Komplexität dieser Wechselwirkungen, häufig schwierig. Daher werden Gerüststrukturen benötigt, die die präzise multivalente Präsentation und kontrollierte Veränderung einzelner Parameter gestatten.

Nukleinsäuren werden schon lange nicht mehr nur als Träger unserer Erbinformationen betrachtet. Die besondere Struktur der DNA-Doppelhelix und ihre einzigartigen Eigenschaften inspirierten in der Vergangenheit zu ihrer Anwendung als Strukturtemplat. Die Fähigkeit zur Selbstassemblierung nach den Basenpaarungsregeln von Watson und Crick wurde genutzt, um vielfältige DNA-Architekturen zu generieren, die aufgrund der helikalen Periodizität und hohen Rigidität eines DNA-Duplex in Form und Größe definiert sind.^[14-15] Die zielgenaue Anbringung funktioneller Verbindungen ermöglicht die Untersuchung biologischer Fragestellungen der molekularen Lebenswissenschaften. Die multivalente Präsentation auf nukleinsäurebasierten Architekturen ist dafür besonders interessant, weil damit Strukturen in nahezu beliebigen Längenskalen und biologisch aktive Verbindungen unter Kontrolle der Valenz und Nukleotidabstände, herstellbar sind.^[16-29] In der vorliegenden Arbeit werden Nukleinsäurerüste verwendet, um die Bedingungen für effiziente multivalente Wechselwirkungen mit Hämagglutininen auf viralen Partikeln zu untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse können der Entwicklung hochpotenter Verbindungen auf Nukleinsäurebasis oder Kleinmolekülen dienen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Multivalente Wechselwirkungen und deren Charakterisierung

Multivalenz ist ein Schlüsselprinzip in der Natur, um affine und reversible Interaktionen zu erreichen. Ein Beispiel aus der makroskopischen Welt veranschaulicht das Wesen multivalenter Wechselwirkungen: Beim Anhaften einer Klette auf einer Baumwolloberfläche interagieren viele Haken der Klette mit den Baumwollfäden, die als Ösen fungieren. Erst die Vielzahl der einzelnen Haken-Ösen-Interaktionen führt zu einer starken Anbindung der Klette, die aufgrund der Schwäche jeder einzelnen Interaktion umkehrbar ist. Auf mikroskopischer Ebene finden sich dafür viele Beispiele bei Erkennungs-, Adhäsions- und Signalprozessen. Besonders bekannt ist dabei die Anhaftung von Pathogenen an Wirtszellen, die den Ausgangspunkt für Infektionen markieren können. Allgemein betrachtet, handelt es sich um die Wechselwirkung eines Bindungspartners mit n Liganden mit einem zweiten Bindungspartner mit m Rezeptoren, wobei n und m größer eins sind.

Häufig sind bei biologischen Erkennungsprozessen Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydrat-Liganden und Lektinen involviert, wobei entsprechende Affinitäten und Selektivitäten erst über Multivalenz erzeugt werden. Da die Blockierung von Lektinen zur Bekämpfung vieler Krankheiten relevant ist, ist ein besseres Verständnis der vorherrschenden multivalenten Wechselwirkungen von großem Interesse. In der Vergangenheit hat dies viele Forscher zur Entwicklung neuartiger multivalenter Gerüststrukturen inspiriert. Ein in diesem Zusammenhang besonders schillerndes Beispiel für multivalente Bindungsverstärkung lieferten *Bundle et al.*^[30] Sie entwickelten den hochpotenten „Starfish“-Inhibitor für das Shiga-ähnliche Toxin I (SLT-1). Dieser basierte auf der Anordnung von zehn Trisacchariden um einen Glucose-Kern und zeigte eine millionenfach gesteigerte Inhibition gegenüber dem monovalenten Inhibitor. Diese unter Verwendung von nur wenigen Liganden erzielte Verstärkung demonstriert die Leistungsfähigkeit multivalenter Kohlenhydrate.

Theoretische Beschreibungen multivalenter Wechselwirkungen sind aufgrund der häufig vorliegenden Komplexität der Systeme und der zum Teil gleichzeitig vorliegenden Effekte schwierig. Dennoch lassen sich einige grundlegende Prinzipien am Beispiel der Wechselwirkung eines bivalenten Ligandensystems mit einem bivalenten Rezeptor verdeutlichen. Allgemein wird ein Ligand über einen Linker mit einem Gerüst verknüpft. Die resultierende Bindungsaffinität zwischen multivalenter Verbindung und einem Rezeptor wird dominiert von der Kompensation zwischen Bindungsenthalpie und Entropie. Beispielsweise eröffnet sich einem System bei Verwendung eines flexiblen Rückgrats ein hohes Maß an Bewegungsfreiheit, die bei multivalenter Anbindung an den

Rezeptor zu einer Zunahme an Konformationsentropie führt (Abbildung 1 A). Bei starrer Verknüpfung der Liganden wird die entropische „Bestrafung“ reduziert und die Bindungsaffinität erhöht, sofern die Liganden optimal für die Wechselwirkung mit den einzelnen Bindungsstellen des zweiten Bindungspartners positioniert sind (Abbildung 1 B). Bei suboptimaler Vororganisation der beiden Liganden würde eine starre Verknüpfung zu einem Verlust an Bindungsenthalpie führen.^[10] Eine zu kurze Verbrückung der Liganden resultiert darin, dass nur eine Bindungsstelle des Rezeptors besetzt werden kann und eine energetisch günstige, chelatisierende Verbrückung der Bindungsstellen, verhindert wird. Bei zu langer Verbrückung vergrößert sich die Anzahl unproduktiver Freiheitsgrade, was wiederum die Bindungsaffinität verringert.^[31] Diese Extremfälle sollen verdeutlichen, wie wichtig die Gerüstarchitektur bei der Entwicklung potenter multivalenter Verbindungen ist und lassen erahnen, welchen großen Stellenwert dabei Optimierungsprozesse einnehmen.

Netz et al.^[32] haben mit Polymermodellen der statistischen Mechanik den Einfluss der Länge und Flexibilität des Rückgrats auf die Bindungsaffinität untersucht. Ihre Ergebnisse unterstreichen, dass bei perfekter Vororganisation der Liganden ein starres Gerüst prinzipiell besser geeignet ist, um hohe Bivalenzeffekte zu erzielen. Der Grund dafür ist eine höhere effektive Konzentration, was in diesem Zusammenhang die Wahrscheinlichkeit darstellt, dass die zwei Liganden genau in dem passenden Abstand für eine bivalente Wechselwirkung mit den beiden Bindungsstellen des Rezeptors präsentiert werden. Andererseits hängt der Bivalenzeffekt auch von der intrinsischen Affinität der Liganden ab. So kann bei sehr schwachen Liganden ein Bivalenzeffekt ausbleiben, obwohl diese räumlich optimal angeordnet sind. *Seitz et al.*^[33] entwickelten nukleinsäurebasierte Modellsysteme die auf der Wirt-Gast-Interaktion von Cucurbit[7]uril und Adamantan beruhen und eine Kontrolle über die Stärke der einzelnen Erkennungsmotive und deren Abstände erlauben. In systematischen Untersuchungen konnten die Autoren zeigen, dass die Bivalenzverstärkung i) vom Abstand der Erkennungsmotive, ii) von der Gerüstflexibilität und iii) von der Stärke der monovalenten Interaktion, limitiert wird.

Durch Verwendung voluminöser Gerüste können sterische Abschirmeffekte auftreten, wodurch der Zugang zu weiteren Bindungsstellen des Rezeptors blockiert werden kann (Abbildung 1 C). Dieser Effekt wurde in Studien mit Polyacrylamidsialosiden gegen Influenza A-Viren (IAV) bereits früh beschrieben.^[34] Weiterführende Arbeiten zeigten eine verbesserte Inhibition von IAV bei steigender Partikelgröße sphärischer Polyglycerol-Sialinsäure-Konjugate.^[35] Eine quantitative Beschreibung des Einflusses der Größe sphärischer Inhibitoren und sterischer Abschirmung erfolgte in einem experimentell-theoretischen Ansatz von *Vonnemann et al.*^[36] Danach sollte der Durchmesser des optimalen sphärischen Inhibitors in den meisten Fällen kleiner als der Durchmesser des Rezeptors sein.

Eine andere Ursache für starke multivalente Wechselwirkungen kann auftreten, wenn auf einem Gerüst eine große Anzahl an Liganden in räumlicher Nähe vorliegt und dadurch nach Dissoziation eines bestehenden Ligand-Rezeptor-Komplexes, eine erneute Rückbindung begünstigt wird (Abbildung 1 D). Ein illustratives Beispiel aus der Natur, für diesen auch als statistische Rückbindung bezeichneten Mechanismus, liefern die Mucine. Diese sind stark glykosylierte lineare Proteine, die von höheren Organismen zum Schutz von epithelialen Zellen sekretisiert werden. Es wurde demonstriert, dass die Affinität des *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc)-erkennenden Sojabohnenagglutinins für ein etwa 2300 GalNAc-Einheiten aufweisendes Mucin, um sechs Zehnerpotenzen höher ist, als die Affinität des monovalenten Zuckers.^[37]

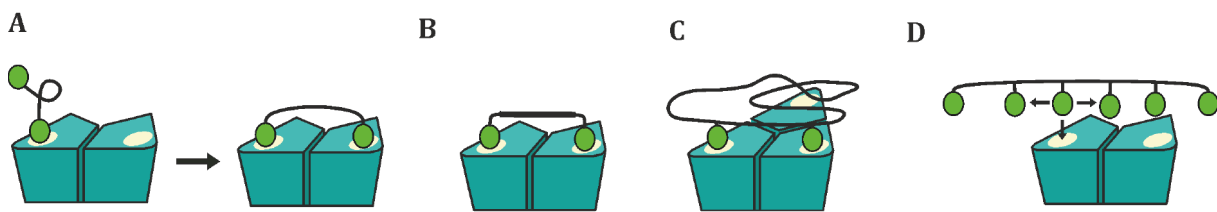


Abbildung 1: Möglichkeiten multivalenter Wechselwirkungen. (A) Bei Verbrückung von zwei Liganden über ein flexibles Rückgrat erfolgt eine höhere entropische „Bestrafung“ als bei der Verknüpfung über (B) ein starres Rückgrat mit optimaler Vororganisation der Liganden (Chelateffekt). (C) Abschirmung von zusätzlichen Bindungstaschen durch ein sterisch anspruchsvolles Rückgrat (sterische Abschirmung). (D) Erleichterte Rückbindung durch hohe lokale Konzentration der Liganden (Clustereffekt).

Um multivalente Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen, und damit viele wichtige biologische Prozesse, besser zu verstehen, bedarf es struktureller Informationen.^[38] Hierfür kann die Verwendung konformationell definierter Moleküle in Kombination mit Bindungsassays hilfreich sein. *Peters et al.*^[39-40] entwickelten bivalente Liganden, um benachbarte Bindungsstellen des LecA, welches an der Zelladhäsion des Pathogens *Pseudomonas aeruginosa* beteiligt ist, zu überbrücken. Hierfür wurden zwei Galactose-Liganden verwendet, die über ein starres Gerüst aus sich wiederholenden Kohlenhydrat-Triazol-Einheiten verbrückt wurden (Abbildung 2 A). In einem enzymgebundenen Immunosorbens Testverfahren (ELISA) zeigte sich, dass bereits kleine Veränderungen der Länge des verbrückenden Elements einen großen Einfluss auf die Inhibition des Lektins ausübte. Während die bivalente Verbindung **1A**, die die beiden Liganden am kürzesten voneinander separierte, sogar schlechter als die monovalente Referenz inhibierte, zeigten längere Verbrückungen exzellente Verstärkungsfaktoren (**1B**: 545-fach und **1C**: 7555-fach). In Molekülmodellierungen konnte bestätigt werden, dass eine gleichzeitige bivalente Wechselwirkung nur für **1B** und **1C** ermöglicht wird, während **1A** dafür zu kurz ist.

Die effektive Verbrückung von Bindungsstellen in größeren Abständen stellt eine besondere Herausforderung dar.^[9] Konformationell flexible Gerüste werden dabei sehr lang und könnten in wenig selektiven Systemen resultieren. Geeigneter könnten in diesem Zusammenhang Architekturen

sein, die eine hohe Persistenzlänge aufweisen. Nukleinsäuregerüste erscheinen dafür prädestiniert, da aufgrund der Rigidität gepaarter Duplexe ihre Länge über einen großen Abstandsbereich kontrolliert werden kann. Einige illustrative Beispiele nukleinsäurebasierter Gerüste werden in Kapitel 2.3 vorgestellt.

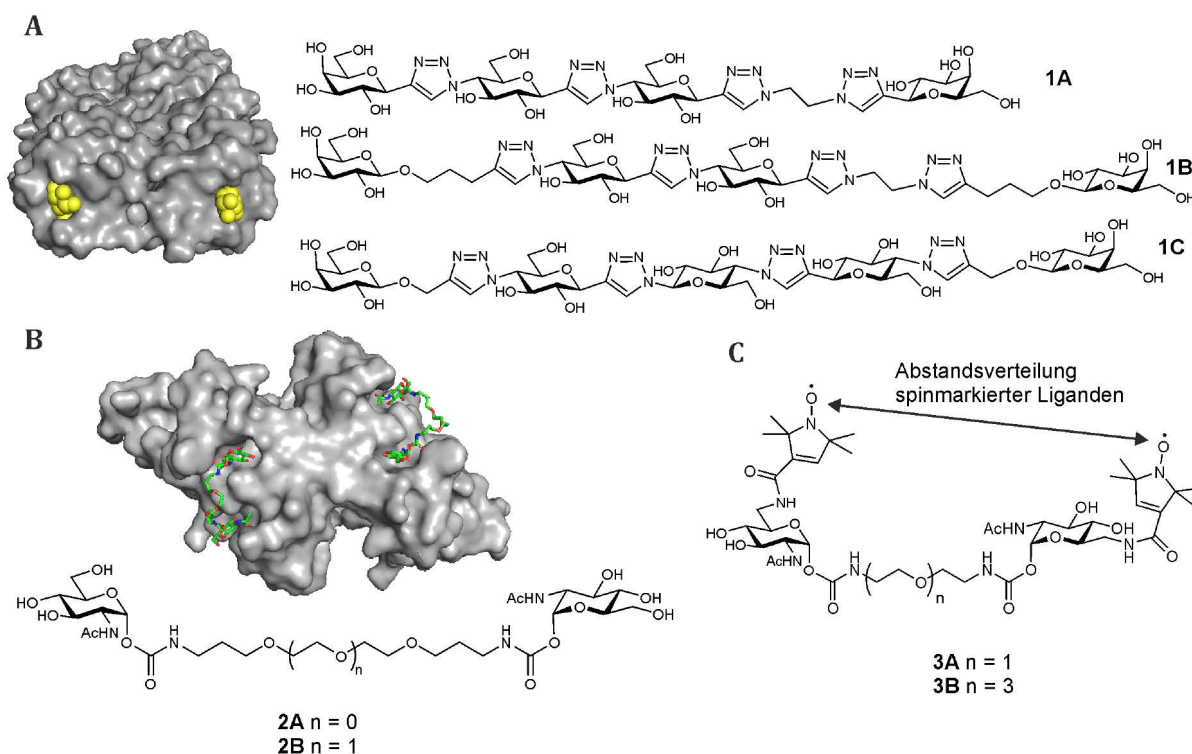


Abbildung 2: Möglichkeiten zur strukturellen Untersuchung multivalenter Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen. (A) Konformationell eingeschränkte, bivalente Galactoside **1A-C** unterschiedlicher Länge zur Inhibition des tetrameren Leca.^[39] Nach röntgenkristallographischer Analyse beträgt der kürzere der beiden Abstände zwischen den Galactose (gelb)-Bindungsstellen etwa 26 Å (1OKO.pdb). Die zwei anderen Bindungsstellen werden in der Darstellung verdeckt. (B) Kristallographische Untersuchung eines Komplexes aus Weizenkeimagglutinin (WGA) und vier Molekülen des bivalenten Ethylenglykol-verbrückten *N*-Acetylglucosamins **2A** (2X52.pdb).^[41] In dieser Darstellung sind nur zwei Moleküle **2A** sichtbar, die anderen beiden befinden sich auf der Rückseite des Lektins. (C) Elektronenspinresonanz (EPR)-spektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung der bivalenten, spinmarkierten Verbindungen **3A-B** mit WGA.^[42]

Röntgenkristallographische Aufnahmen von Komplexen aus multivalenten Bindern und ihren Zielproteinen können sehr detaillierte Informationen über den vorherrschenden Bindungsmodus liefern. Wittmann *et al.*^[41] untersuchten die Wechselwirkung von bivalenten Verbindungen mit dem Weizenkeimagglutinin (WGA) mittels eines Enzym-gekoppelten Lektin-Assay (ELLA) und Röntgenkristallographie. WGA ist ein Dimer, dessen acht Bindungsstellen (vier primäre Bindungsstellen mit hoher Affinität und vier sekundäre Bindungsstellen mit schwacher Affinität) *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc)-Liganden erkennen. Die bivalente Verbindung **2B**, bei der die GlcNAc-Liganden über drei Ethylenglykol-Einheiten voneinander getrennt werden, zeigte eine beeindruckende multivalente Verstärkung (1170-fach pro Zucker). Röntgenkristallographische Aufnahmen

des Komplexes aus WGA und der sehr ähnlichen Verbindung **2A**, bei der nur 2 Ethylenglykol-Einheiten verwendet wurden, lieferten eine Erklärung für diesen starken multivalenten Effekt (Abbildung 2 B). Pro WGA wurden vier Moleküle der bivalenten Inhibitoren gebunden, in dem jeweils zwei benachbarte Bindungsstellen überbrückt wurden. Damit konnte die gleichzeitige Funktionalität aller acht Bindungsstellen demonstriert werden. Im Gegensatz dazu offenbarte die Kristallstruktur in Gegenwart des monovalenten Binders (nicht gezeigt), dass dieser nur die hochaffinen primären Bindungsstellen des WGA belegt. Demzufolge bietet die gesteigerte Bindungsaffinität bivalenter, chelatisierender Liganden eine Möglichkeit, schwache sekundäre Bindungsstellen zu identifizieren, die sonst womöglich unbemerkt bleiben würden.

Abstandsmessungen zwischen Bindungsstellen sind mittels Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie auch in Lösung möglich. Hierzu verwendeten *Wittmann et al.*^[42] Polyethylenglykol (PEG)-verbrückte Liganden, die durch Nitroxid-Gruppen spinmarkiert wurden (Abbildung 2 C). Diese flexiblen Moleküle zeigten in Lösung, ohne Zusatz des Zielproteins WGA, eine breite Signalverteilung. In Gegenwart von WGA wurden dagegen Abstand-Signalbeziehungen erhalten, die Rückschlüsse auf vorliegende Bindungsmechanismen gestatteten. Bei **3A**, wo die beiden GlcNAc-Liganden nur durch eine Ethylenglykol-Einheit getrennt vorliegen, konnte lediglich eine monovalente Anbindung an das Zielprotein erkannt werden, wohingegen die längere Verbrückung über drei Ethylenglykol-Einheiten in **3B** eine chelatisierende Anbindung an das Lektin ermöglichte. Zusätzlich gelang durch Titration mit monovalenten, spinmarkierten Liganden die Bestimmung von Bindungsaffinitäten individueller Bindungsstellen.

2.2 Influenza-Virus und antivirale Strategien

2.2.1 Virusstruktur und Replikationsmechanismus

Ein prominentes Beispiel einer multivalenten Wechselwirkung in der Natur findet sich bei der Anbindung von Influenza-Viren an Wirtszellen im respiratorischen Trakt, welche durch Wechselwirkungen zwischen viralen Hämagglutininen und der zellulären Glykokalyx vermittelt wird. *Whitesides et al.*^[3] schätzten, dass hierbei eine multivalente Verstärkung um acht Zehnerpotenzen gegenüber der monovalenten Wechselwirkung von Hämagglutinin und Sialinsäure erzielt wird. Die Anbindung des Virus markiert den initialen Schritt des viralen Replikationszyklus und kann zum Ausbruch einer akuten Atemwegsinfektion führen, wodurch eine Virusgrippe („Influenza“) ausgelöst werden kann. Jährlich sind etwa drei bis fünf Millionen Menschen weltweit von einer Virusgrippe betroffen, wobei 250.000 – 500.000 Menschen den Folgen dieser Infektion erliegen.^[43]

Influenza-Viren sind umhüllte Viren, die innerhalb der viralen Membran eine einzelsträngige Ribonukleinsäure (ssRNA) aus acht Genomsequenzen aufweisen. Auf der viralen Membran befinden sich die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase, nach denen eine Unterteilung in verschiedene Subtypen mit der Kodierung H_XN_Y ($X = 1-18$, $Y = 1-11$) erfolgt. Die Stämme H1-3 sind besonders humanpathogen, da sie $\alpha 2,6$ -Sialoside erkennen, die im oberen respiratorischen Trakt von erwachsenen Menschen vorkommen. Im Gegensatz dazu erkennen aviäre Viren $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialoside.^[44] Wie in mikroskopischen Aufnahmen des A/X31 (H3N2)-Subtyps deutlich zu erkennen ist, können Influenza-Viren eine pleomorphe Struktur aufweisen, wobei sphärische und filamentöse Formen von 100 – 300 nm auftreten können (Abbildung 3 A).^[45-46] Auf der viralen Oberfläche werden die Glykoproteine in hoher Dichte exprimiert, deren Anzahl dabei zwischen 300 – 400 für das Hämagglutinin und 30 – 40 für die Neuraminidase variiert.^[47] Beim Hämagglutinin (Abbildung 3 B (blau) und 3 C (grau)) handelt es sich um ein homotrimeres Transmembranprotein, das pro Monomer eine kanonische Bindestelle für Sialoside (Abbildung 3 C (gelb)) auf der oberen Kopfdomäne aufweist. Die in wesentlich geringerer Dichte auftretende Neuraminidase (Abbildung 3 (grün)) ist ein homotetrameres Glykoprotein, welches je Monomer ein katalytisches Zentrum geringer Aktivität enthält. Dessen biologische Funktionen umfassen die Freisetzung von neu entstandenen Viruspartikeln von der Wirtszellenmembran sowie die Verhinderung der Virusaggregation durch Interaktion von Hämagglutininen mit Glykostrukturen anderer Viren. Das Matrixprotein-2 (Abbildung 3 B (orange)) ist ein tetrameres Tunnelprotein, welches ebenfalls in die virale Lipidschicht integriert ist. Als Protonenkanal ist dieser Bestandteil an der Freisetzung des viralen Genoms beteiligt.^[48]

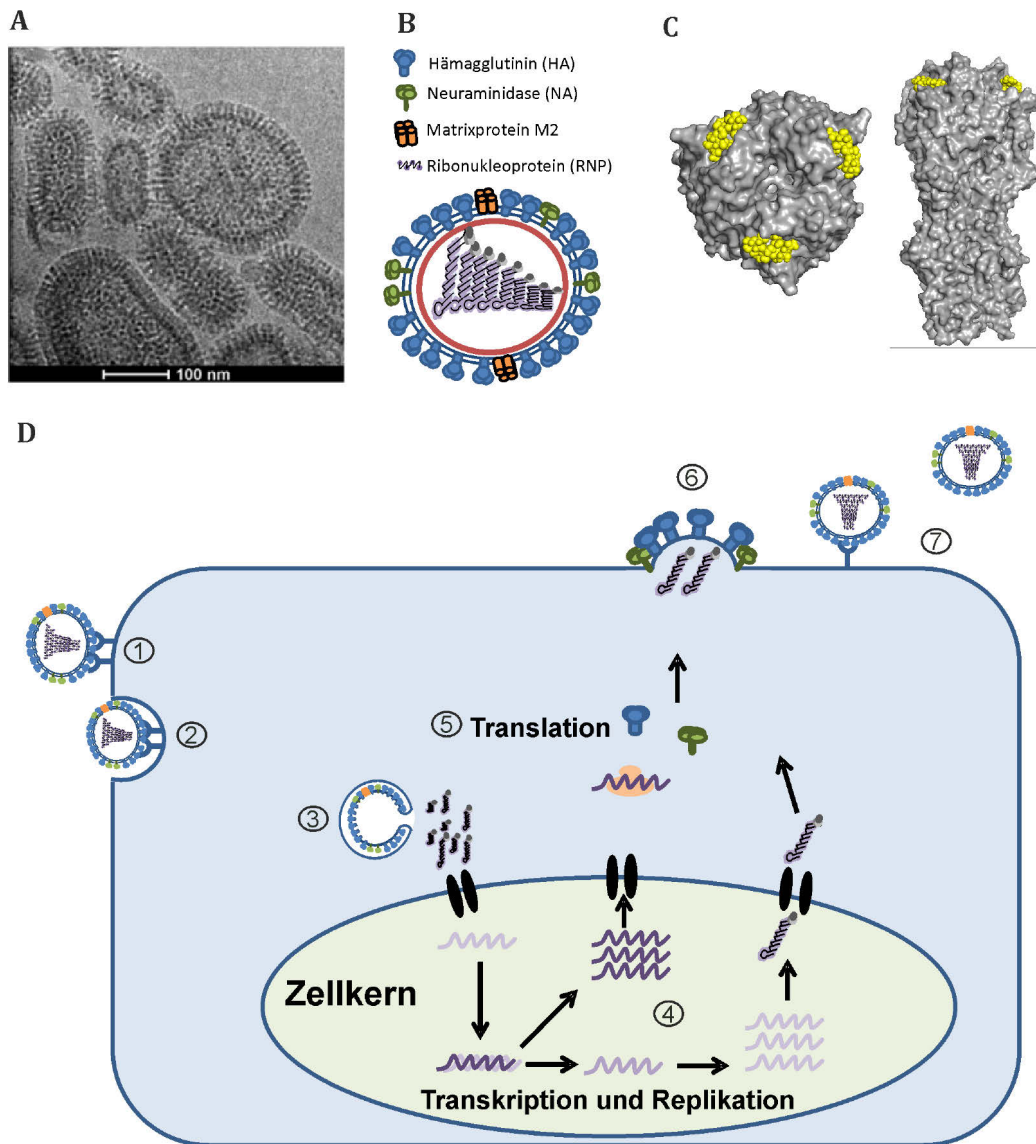


Abbildung 3: (A) Kryoelektronenmikroskopische Aufnahme von Influenza A/X31 (H3N2)-Viruspartikeln. Das Bild wurde freundlicherweise von Dr. Kai Ludwig (FU Berlin) zur Verfügung gestellt. (B) Bestandteile des Influenza-Virus.^[47] Hämagglutinine (blau), Neuraminidasen (grün) und Matrixproteine-2 (orange) sind in der viralen Lipidschicht (blaue Kreise) verankert und umhüllen das virale Erbgut. (C) Aufsicht der Kopfdomäne (links) und Seitenansicht (rechts) des Hämagglutinins (grau) mit Sialosiden (gelb) in den kanonischen Bindungstaschen (1HGG.pdb). (D) Replikationszyklus des Influenza-Virus: 1) Anbindung an Wirtszelle über multiple Hämagglutinin-Sialinsäure-Wechselwirkungen, 2) Zelleintritt des Virus über Endozytose, 3) Freisetzung des viralen Genoms in das Zytosol nach Öffnung der viralen Membran, 4) Transkription und Replikation des viralen Genoms im Zellkern, 5) Bildung der viralen Proteine, 6) Ausstülpung des Virus, 7) Neuraminidase-vermittelte Trennung von Virus und Wirtszelle. Die Abbildungen B und D basieren auf Abbildungen die freundlicherweise von Dr. Daniel Lauster (HU Berlin) zur Verfügung gestellt wurden.

Nach Initiation des Replikationszyklus durch Anbindung der Viren über Hämagglutinine an sialinsäurehaltige Glykoproteine der Wirtszelle erfolgt der Zelleintritt durch Endozytose (Abbildung 3 D).^[49] Eine Verringerung des pH-Wertes führt zu einer Konformationsänderung in einer Untereinheit des Hämagglutinins, was zur Ausbildung einer Fusionspore führt.^[50] Daraufhin öffnet sich die

Virusmembran und die viralen RNA-Segmente werden in das Zytosol der Zelle freigesetzt. Nach Transkription und Replikation im Zellkern, wird die gebildete mRNA im Zytosol und am rauen endoplasmatischen Retikulum translatiert.^[51] Nun werden die viralen Proteine und die RNA zusammengeführt, woraufhin neue Viruspartikel von der Wirtszelle abgeschnürt werden. Die neu gebildeten Viren werden von der Außenseite der Zelle, vermittelt durch die Neuraminidase, abgespalten.^[52]

2.2.2 Antivirale Strategien

Die einzelnen Gattungen der verschiedenen Influenza-Viren sind epidemiologisch sehr unterschiedlich. Von den Influenza-Viren der Gattungen D und C sind bisher keine oder nur sehr wenige Infektionen ausgegangen und von Influenza B-Viren sind nur Epidemien mit mildem Ausmaß bekannt. Allerdings wurden von Influenza A-Viren in der Vergangenheit verheerende Pandemien verursacht.^[53] Beispielsweise nahm die Spanische Grippe von 1918/1919 (H1N1) etwa 50 Millionen Menschen das Leben, der Hongkong-Grippe im Jahr 1968 (H3N2) fielen etwa 1 Millionen Menschen zum Opfer und die Mexikanische Grippe von 2009 (H1N1)pdm09 forderte etwa 575.000 Menschenleben.^[54] Eine zunehmende Urbanisierung und Globalisierung stellen gegenwärtig eine zusätzliche Gefahr dar, weil dadurch eine schnelle Verbreitung der Viren begünstigt wird.^[55] Als Ursache für Pandemien wird vor allem im asiatischen Raum das enge Zusammenleben von Mensch und Tier vermutet, weshalb es leichter zur Übertragung zoonotischer Viren, vom Tier auf den Menschen, kommen kann.

Obwohl bisher in der Literatur viele Substanzen beschrieben wurden, die an unterschiedlichen Stellen in den Replikationszyklus des Virus eingreifen, sind in Europa für die klinische Behandlung nur zwei Neuraminidase-Inhibitoren (Oseltamivir und Zanamivir) und ein M2-Protonenpumpenhemmer (Amantadin) zugelassen.^[56-57] Momentan müssen diese monovalenten Wirkstoffe in der klinischen Behandlung in relativ hohen Dosen eingesetzt werden. Aufkommende Resistenzen gegen die derzeit eingesetzten Medikamente stellen eine zusätzliche Herausforderung dar und üben einen Druck auf die Entwicklung neuartiger antiviraler Substanzen mit anderen Wirkmechanismen aus.

Antivirale Strategien können darin unterschieden werden, dass sie i) direkt gegen den Virus wirken, ii) für den Virus entscheidende Wirtsfaktoren beeinflussen oder iii) immunregulierend eingreifen.^[58-60] Dabei gehören die oben genannten Wirkstoffe zu den spezifisch gegen den Virus gerichteten Substanzen. Amantadin blockiert das M2-Protein und verhindert dadurch die Freisetzung der viralen Erbinformation innerhalb der Wirtszelle, wohingegen die beiden Neuraminidase-Inhibitoren im Ablösevorgang der Viren von der Wirtszelle interferieren. Aufgrund seiner beson-

deren Rolle im Replikationszyklus stellt das Hämagglutinin (HA) eine weitere attraktive Zielstruktur dar. In diesem Zusammenhang zielen antivirale Strategien auf die Reifung des HA, die HA-Sialinsäure-Interaktion und die Aktivität der HA-Fusion ab.^[56]

Durch Blockierung der Sialinsäure-Bindestellen kann die virale Adhäsion an die Wirtszelle verhindert werden. Da die natürlich vorkommenden Sialinsäure-Liganden gegenüber dem Hämagglutinin nur eine geringe Affinität im millimolaren Bereich aufweisen^[61], sind diese nur schlecht zur Inhibition der HA-Wirtszellen-Interaktion geeignet. *Toogood et al.*^[62] gelang es, durch Derivatisierung mit hydrophoben Aglykonen an der 2-Position von Sialinsäuren, im Hämagglutinationstest eine bis zu 64-fach stärkere Inhibition zu erreichen. In einer Folgestudie^[63] wurde dieser Ligand an der 4-Position mit einem fluoreszenten Aglykon erweitert, was in einer niedrigen mikromolaren Dissoziationskonstante für die Wechselwirkung mit dem Hämagglutinin resultierte ($K_D = 3.7 \mu\text{M}$). Mit Peptid^[64-65]- und Aptamerliganden^[66-67] sowie Antikörpern^[68-69], wurden sogar nanomolare Binder für einige HA-Varianten erzielt.

2.2.3 Multivalente Glykokonjugate für das virale Hämagglutinin

Eine vielversprechende Möglichkeit für das Eingreifen in die Virus-Zell-Interaktionen stellen multivalente Glykokonjugate für das virale Hämagglutinin dar. Durch Ausnutzung multivalenter Verstärkungseffekte können wesentlich effektivere Inhibitoren als die klassischen monovalenten Wirkstoffe erhalten werden. Zudem können sie dazu beitragen, die den biologischen Prozessen zugrundeliegenden molekularen Bedingungen, zu entschlüsseln, was wiederum die Entwicklung anderer effizienter (multivalenter) Inhibitoren begünstigen könnte. Multivalente Inhibitoren würden das Virus nur blockieren und nicht aktiv beseitigen, was die Chancen der Entwicklung von Wirkstoffresistenzen mindern könnte. Blockierte Viren sind nicht mehr in der Lage sich zu replizieren und können dann von Makrophagen abgebaut oder vom retikuloendothelialen System entfernt werden.^[70-71]

Es gibt bislang nur wenige Beispiele multivalenter Glykokonjugate, die in der klinischen Anwendung erprobt wurden. Dies offenbart, dass die pharmazeutische Industrie das Konzept der multivalenten Inhibitoren noch nicht verfolgt.^[12] Neben einer anspruchsvolleren Optimierung der multivalenten Gerüste, im Vergleich zu herkömmlichen monovalenten Substanzen, stellen Toxizität, Biokompatibilität und eine geringe *in vivo* Wirksamkeit, kritische Parameter für die Anwendung in klinischen Studien dar. Nichtsdestotrotz wurde in der Literatur die Entwicklung vieler unterschiedlicher multivalenter Gerüste für die Verhinderung der Virus-Zell-Adhäsion beschrieben. Mittels multivalenter Präsentation von Glykoliganden auf Polymeren^[72-78], Nanopartikeln^[79-83] und Dendrimeren^[84-86] wurden bereits bemerkenswerte Affinitätssteigerungen erzielt. Beispielsweise berichten *Whitesides et al.*^[77] von Sialosid-Polyacrylamidpolymeren $4_{n,m}$, die gegen den

A/X31-Virus eine um fünf Größenordnungen bessere Bindung und Inhibition als die monovalenten Sialoside in Lösung aufweisen (Abbildung 4 A). Eine zunehmende Polymerlänge erwies sich dabei als vorteilhaft. Die Autoren liefern indirekte Beweise, dass die erzielte Inhibition der Anbindung von Antikörpern an die Viren, durch sterische Abschirmung des Virus durch die Polymere erzielt wurde. Die Wahrscheinlichkeit das Glykocluster auch an andere Sialinsäure-Rezeptoren im Organismus binden ist jedoch sehr hoch, weshalb eine durch geringe Spezifität verursachte Toxizität deren Gebrauch einschränken könnte. Darüber hinaus lassen sich, aufgrund der statistischen Verteilung der Liganden, häufig nur wenig Aussagen über die strukturellen Voraussetzungen, die zur hochaffinen Bindung führen, ableiten. Viele der teuren Glykoliganden könnten redundant sein oder sogar eine affinere Wechselwirkung behindern.

Eine Möglichkeit hohe Ligandenökonomie zu erzielen, bieten rational entworfene Inhibitoren. Meyer *et al.*^[87] stellten das trivalente Glykopeptid **5** vor, welches zunächst *in silico* für die Anbindung an das C3-symmetrische Hämagglutinin (H5) eines Vogelgrippevirus entworfen wurde (Abbildung 4 B). Darin ist ein Trimesinsäure-Kern über drei flexible Hexylketten mit Nonapeptid-Linkern verbunden. Die Sialinsäure-Liganden wiederum sind über eine flexible Butylkette mit dem N-Terminus des Peptid-Linkers verknüpft. Mit diesem maßgeschneiderten Molekül konnte ein nanomolarer Binder ($K_D = 446 \text{ nM}$) erhalten und die Affinität gegenüber dem monovalenten Liganden um mindestens den Faktor 4000 gesteigert werden. Das monovalente Kohlenhydrat-Peptid-Konjugat zeigte in den durchgeführten NMR-Experimenten kein kompetitives Verhalten bezüglich der primären Kohlenhydratbindungsstelle. Dieser Ansatz benötigt allerdings Informationen über die genaue Verteilung der Bindungsstellen auf dem multivalenten Rezeptor. Dieses Wissen ist aber aufgrund fehlender Röntgenkristallstrukturen oder evolutionsbedingter Veränderungen des Zielproteins nicht immer verfügbar. Weiterhin erscheint es schwierig, die Verbrückung mehrerer Hämagglutinine auf der viralen Oberfläche zu berücksichtigen.

Von besonderem Interesse sind daher Ansätze, die ohne vorheriges Wissen über die räumliche Verteilung von Bindungsstellen auf dem multivalenten Rezeptor auskommen und die optimalen Bedingungen für hochaffine multivalente Bindung ermitteln können. In früheren Arbeiten von Knowles *et al.*^[88] wurden die bivalenten Sialinsäure-Polyglycinkonjugate **6_p** verwendet und die Anzahl der Glycineinheiten zwischen den Liganden variiert (Abbildung 4 C). Dabei bewiesen Konjugate, die zwei Liganden durch Verwendung von acht Glycineinheiten separierten ($p = 4$), eine mindestens um eine Größenordnung stärkere Inhibition des A/X31-Virus als bei Verwendung von null, zwei oder vier Glycineinheiten. Aufgrund des flexiblen Rückgrats sind nur schwer allgemeine Aussagen über den Abstand der Liganden in Lösung zu treffen. Jedoch unterstreicht die beobachtete Abhängigkeit der Inhibition von der Anzahl verbrückender Glycineinheiten die Bedeutung der räumlichen Vororganisation der Liganden für die Entwicklung effektiver multivalenter Binder. In

dieser Studie wurden auch die PEG-verbrückten bivalenten Verbindungen **7_q** untersucht, in denen die beiden Liganden 37 – 49 Atome voneinander separiert wurden (Abbildung 4 C). Für das lösliche Hämagglutinin konnte keine dieser Verbindungen eine gesteigerte Affinität im Vergleich zur monovalenten Sialinsäure zeigen. Die Autoren führen dieses Ergebnis darauf zurück, dass i) die kurze Verbrückung nicht ausreicht, um zwei der drei Bindungsstellen eines Trimers zu erreichen oder ii) die hohe Flexibilität des Gerüsts eine bivalente Anbindung aufgrund zunehmender Entropie energetisch benachteiligt.

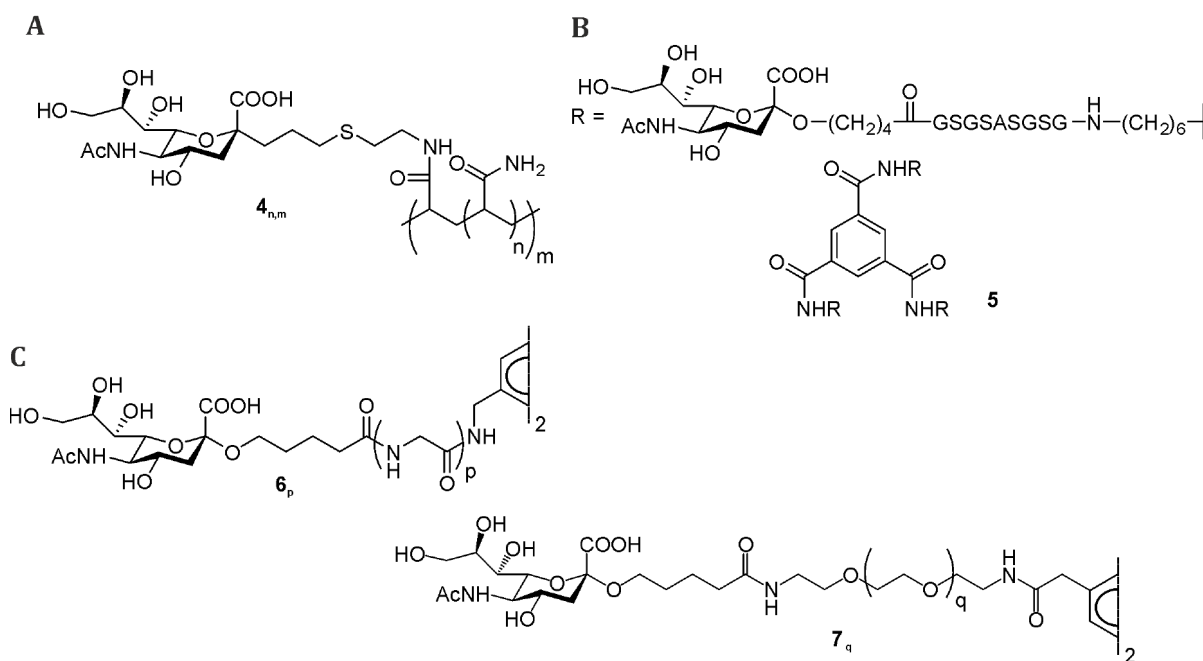


Abbildung 4: Beispiele multivalenter Inhibitoren des Influenza-Virus. (A) Multivalente Sialyl-Polyacrylamide **4_{n,m}** von Whitesides *et al.*^[77] Polymere der Massenfraction die etwa 150 Monomer-Einheiten entsprachen ($m \approx 30$, $n \approx 4$, **4_{4,30}**) inhibierten die Hämagglutination des A/X31-Virus mit einem KiHAI^{SA} (**4_{4,30}**) < 15 nM. (B) Das trivalente Sialyl-Peptid **5** von Meyer *et al.*^[87] zeigte eine nanomolare Dissoziationskonstante für die Wechselwirkung mit dem H5-Trimer ($K_D = 446$ nM). (C) Bivalente Sialyl-Polyglycin- ($p = 0 - 4$, **6_p**) und Sialyl-PEG-Konjugate ($q = 1 - 3$, **7_q**) von Knowles *et al.*^[88]

2.3 Nukleinsäure-Gerüste als multivalente Binder

Die Verwendung von Nukleinsäuremolekülen als Strukturtemplat bietet faszinierende Möglichkeiten für die multivalente Präsentation von Liganden.^[9-10, 12] Auf Grundlage der Watson-Crick-Basenpaarungsregeln können in Form und Größe definierte Strukturen generiert werden. Die Periodizität einer Nukleinsäurehelix ermöglicht funktionelle Gruppen mit Angström-Genauigkeit unter Kontrolle ihrer Valenz und räumlichen Orientierung zu präsentieren. Mittels chemischer und biologischer Synthese können diese Gerüste in nahezu beliebigen Längenskalen erhalten werden. Ein weiterer Vorteil stellt die Rigidität des DNA-Rückgrats über eine lange Distanz dar. Die hohe Persistenzlänge eines vollständig gepaarten DNA-Duplexes von etwa 500 Å oder 150 Basenpaaren erlaubt dessen Betrachtung als starren Stab.^[89-90] Dessen Flexibilität kann jedoch durch Verwendung ungepaarter Nukleotide (nt) oder Einzelstrangbrüche stufenweise erhöht werden. Der polyanionische Charakter von DNA-Komplexen sorgt zudem für eine gute Löslichkeit im wässrigen Milieu, was für biologische Untersuchungen vorteilhaft ist.

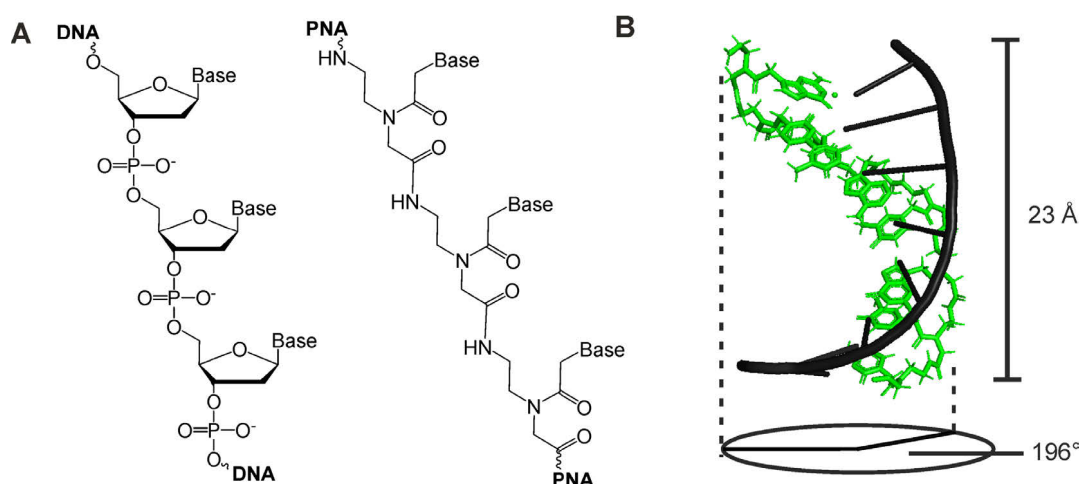


Abbildung 5: (A) Chemische Struktur von DNA- (links) und Peptidnukleinsäure (PNA)-Oligomeren (rechts). (B) Strukturelle Charakterisierung des PNA-DNA-Hybridkomplexes gctatgtc-d(GACATAGC) mittels Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie (1PDT.pdb).^[91] Bei einer mittleren helikalen Torsion von 28° je Nukleobase und einem mittleren Basenabstand von 3.25 Å, beträgt die helikale Torsion dieses Duplexes 196° bei einem Anstieg von 23 Å. PNA = grün, DNA = schwarz.

Nielsen *et al.* ^[92] entwickelten ein peptidisches Analogon der DNA, das ein ungeladenes Pseudo-peptid aus *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten, anstelle des anionischen, über Phosphodiester verknüpften Desoxyribosephosphat-Rückgrats der DNA, aufweist (Abbildung 5 A). Der Komplex aus komplementären Peptidnukleinsäuren (PNA) und DNA besitzt die Struktur einer Mischung aus A- und B-DNA, bei einem mittleren Basenabstand von 3.25 Å und einer mittleren helikalen Torsion von 28° pro Nukleobase (Abbildung 5 B).^[91] Der Einsatz von PNA-Oligomeren in der DNA-templat-

gesteuerten Ligandenpräsentation hat sich bewährt^[38, 93-94] und ist gegenüber natürlichen Oligonukleotiden mit einigen Vorteilen verbunden: i) steht für die Herstellung der Ligand-PNA-Konjugate das synthetische Repertoire der Peptidchemie zur Verfügung, ii) weisen PNA-DNA-Duplexe eine höhere thermische Stabilität und eine geringere Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung als DNA-DNA-Komplexe gleicher Länge auf und iii) sind sie resistenter gegenüber starken Säuren und Basen und im Gegensatz zu DNA, nicht durch den enzymatischen Abbau von Proteasen bedroht, was für eine Anwendung im biologischen Medium von Bedeutung ist.^[93-94]

Zu den Pionieren auf dem Gebiet der selbstorganisierenden Oligonukleotide zur multivalenten Präsentation von Liganden gehören *Kobayashi et al.*^[19, 95-97] In ihren Arbeiten stellen sie unter anderem die Synthese von Galactose-DNA-Konjugaten vor, die durch den Einbau Galactose-modifizierter DNA-Monomere während der DNA-Festphasensynthese erhalten werden. Durch Oligomerisierung mittels Hybridisierung halbseitig komplementärer kurzer DNA-Oligomere werden supramolekulare Glyko-DNA-DNA-Duplexe mit strenger Periodizität erhalten (Abbildung 6 A). In Untersuchungen mit *Ricinus-communis-Agglutinin 120* (RCA₁₂₀) wurde demonstriert, dass die helikale Torsion des Duplexes die Erkennung der Lektine beeinflusst.

In einer Studie von *Winssinger et al.*^[21] wurde die DNA-templatgesteuerte Hybridisierung verwendet, um in einem kombinatorischen Ansatz die Topologie eines Oligosaccharids aufzuklären, welches eine hohe Aktivität gegenüber den humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-neutralisierenden 2G12 Antikörper aufweist. Dabei erwies sich die benachbarte Hybridisierung eines N- und C-terminal an ein PNA-Oligomer angebrachten Dimannosids als besonders geeignet (Abbildung 6 B).

Seitz et al.^[22] setzten LacNAc-PNA-DNA-Duplexe als molekulare Lineale ein, womit sie eine systematische Rasterung der Abstände der kohlenhydratbindenden Stellen im *Erythrina cristagalli* Lektin durchführten. Dabei wurden LacNAc-PNA-Konjugate erhalten, indem zunächst thioalkylierte PNA-Monomere während der Festphasenpeptidsynthese in PNA-Oligomere eingefügt und anschließend die LacNAc-Liganden in einer Thiol-Maleimidligation an die modifizierten PNA-Oligomere geknüpft wurden (Abbildung 6 C). Unter Verwendung von nur fünf verschiedenen PNA-Oligomeren und deren Permutation auf verschiedenen DNA-Templaten wurden diverse bivalente Komplexe hergestellt. Dabei konnten zwei LacNAc-Liganden in Abständen von 13 – 45 Nukleotiden voneinander getrennt präsentiert werden, was Abständen von etwa 42 – 146 Å entspricht. In dieser Studie konnte eine ausgeprägte Abstand-Affinität-Beziehung festgestellt werden. Der optimale Abstand zwischen den beiden Liganden betrug etwa 104 Å und liegt damit in guter Übereinstimmung mit der über die Röntgenkristallstruktur ermittelten Distanz zwischen den beiden Bindungsstellen des untersuchten Lektins. Weiterhin stellte sich die Verwendung eines flexiblen Komplexes als vorteilhaft heraus. Die Autoren führen dies auf die gegenüberliegende Positionie-

rung der beiden Bindungstaschen des Lektins zurück, weshalb eine bessere Anpassung des Gerüsts an die konkave Proteinoberfläche günstig ist. Bemerkenswert ist, dass trotz der langen Distanz zwischen den beiden Bindungsstellen, eine 80-fache Bindungsverstärkung in Relation zum monovalenten Liganden erzielt werden konnte.

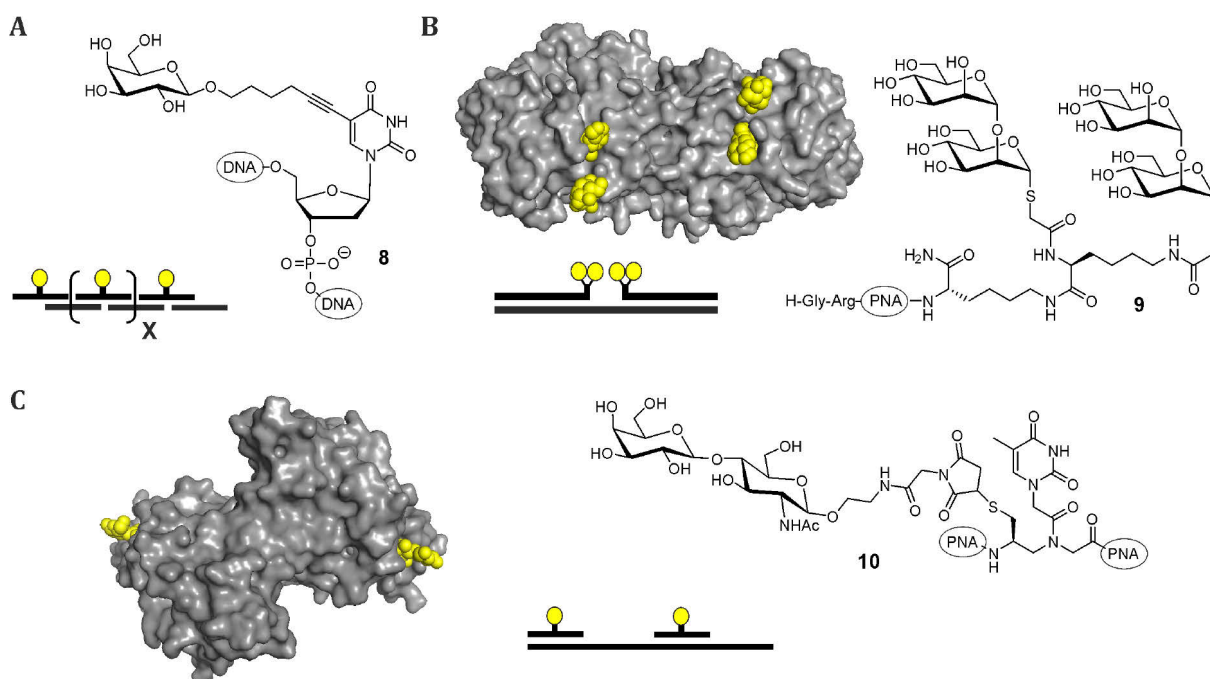


Abbildung 6: Nukleinsäurebasierte multivalente Gerüste zur Untersuchung von Lektinen. (A) β -Galactose (gelb)-modifizierte DNA und selbstorganisierte supramolekulare Gal-DNA-DNA-Komplexe aus halbseitig komplementären DNA-Strängen nach Kobayashi *et al.*^[96] zur multivalenten Erkennung von RCA₁₂₀. (B) DNA-templategesteuerte Assemblierung terminaler Dimannosid-PNA-Konjugate nach Winssinger *et al.*^[21] als multivalente Binder des 2G12-Antikörpers. Die gelben Strukturen kennzeichnen Dimannose-Liganden eines Komplexes aus Fab 2G12 und zwei Man₉GlcNAc₂-Molekülen (10P5.pdb). (C) Das *Erythrina cristagalli* Lektin mit gebundener D-Lactose (gelb) auf gegenüberliegenden Seiten des Lektins (1uzy.pdb). Ein von Seitz *et al.*^[22] entwickelter bivalenter Lactose-PNA-DNA-Duplex mit flexiblen Einzelstrangbereichen zeigte optimale Affinität um die etwa 100 Å entfernten Bindungsstellen des *Erythrina-cristagalli*-Lektin zu überbrücken.

Die Methode der DNA-programmierten räumlichen Rasterung kann ebenfalls nützlich sein, um niedrigaffine, sekundäre Bindungsstellen von Lektinen zu identifizieren.^[16-17, 98-101] Seitz *et al.*^[16] beobachteten in Studien mit dem strukturell sehr gut charakterisierten RCA₁₂₀ eine bimodale Distanz-Affinität-Beziehung, die ein kleineres Affinitätsoptimum bei einem unerwartet kurzen Abstand zwischen den präsentierten Glykoliganden aufwies. Die Autoren erklärten dieses Phänomen mit einer möglichen bivalenten Verbrückung einer primären und sekundären Bindungstasche des Lektins, was ebenfalls mit der Analyse der Röntgenkristallstruktur des mit Galactose kokristallisierten Lektins in Einklang steht.

Appella et al.^[18] demonstrierten das Potential multivalenter PNA·DNA-Komplexe als potente Wirkstoffe gegen Integrine. Diese multivalenten Rezeptoren vermitteln die Zell-Zell-Adhäsion und ihre Überexpression steht im Zusammenhang mit der Metastasierung von Krebs. Sie verknüpften Cyclopeptidliganden an L-Lysin- γ -substituierte PNA (Abbildung 7 A) und hybridisierten die erhaltenen Peptid-PNA-Konjugate DNA-sequenzinstruiert. In einem modularen Ansatz konnten auf diese Weise 1 – 45 Liganden entlang der Nukleinsäurehybride präsentiert werden. Der beste Komplex enthielt 20 Cyclopeptidliganden und zeigte *in vivo* in Mausmodellen eine um zwei Größenordnungen höhere Aktivität als das monovalente Cyclopeptid.

Das *Burkholderia ambifaria* Lektin (*Bambl*) und *Ralstonia solanacearum* Lektin (*RSL*) sind Trimere, die die Form eines sechsblättrigen Propellers aufweisen. Sechs Fucose-Bindungsstellen sind alle auf einer Seite dieser Lektine positioniert und liegen jeweils etwa 20 Å voneinander entfernt (Abbildung 7 B oben). *Winssinger et al.*^[20] synthetisierten PNA-Fucose-Konjugate, bei denen die Fucose-Einheit über flexible PEG-Linker von zwei Seiten mit einem PNA-8mer flankiert werden. Durch Hybridisierung mehrerer solcher Konjugate wurden multivalente Glykokonjugate erhalten, die mehrere Bindungsstellen des *RSL* gleichzeitig überbrücken sollten. Mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie wurde die Affinität der erhaltenen Komplexe bestimmt. Ein hexavalenter Komplex zeigte dabei eine Dissoziationskonstante im niedrigen nanomolaren Bereich, was gegenüber dem monovalenten Zucker eine Verbesserung um den Faktor 700 darstellt. Das zweite untersuchte Lektin, *Bambl*, gehört zur Gruppe der *Burkholderia ambifaria*. Dies sind Bakterien, die unter anderem bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem Lungeninfektionen auslösen können. Zur Inhibition der Bindung von *Bambl* an epitheliale Zellen wurden PNA-Fucose-Konjugate verwendet, die nur auf einer Seite ein PNA-4mer-Palindrom aufwiesen und somit keine stabilen Duplexe in Lösung formen konnten (Abbildung 7 B unten). Eine 723-fach effektivere Inhibition als die monovalente Fucose, führten die Autoren auf die kooperative Interaktion zwischen einem PNA·PNA-Duplex und dem Lektin zurück. Dieses Ergebnis demonstrierte erstmals, dass Kohlenhydrat-Lektin-Interaktionen von dynamischen supramolekularen Ensembles im zellulären Kontext inhibiert werden können.

Ein trigonales DNA-Glykokonjugat in Form einer DNA-3-Wege-Kreuzung wurde von *Ebara et al.*^[102] vorgestellt und dessen Eignung als multivalentes Gerüst in der Bindung an das tetramere *Concanavalin A* demonstriert. Kürzlich wurde dieser Designansatz für die Entwicklung eines an die Topologie des trimeren Hämagglutinin des H1N1-Virus angepassten Inhibitors verwendet.^[103] 2,3-Sialyllactose modifizierte dUTP-Einheiten wurden mittels asymmetrischer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an DNA-Oligonukleotide angefügt, sodass Trisaccharid-DNA-Konjugate erhalten wurden, die an ihren 3'-Enden eins, drei oder fünf Trisaccharide aufwiesen. DNA-Kreuzungen, die aus der Hybridisierung von drei dieser Konjugate mit jeweils drei Trisacchariden erzeugt wurden

(Abbildung 7 C), erwiesen sich im Hämagglutinationstest (HAI) als 80.000-fach potenter als der monovalente Ligand. Dies wurde auf die Möglichkeit einer statistischen Rückbindung der Glykokluster entlang eines DNA-Armes zurückgeführt, da auch ein Komplex mit nur einem modifizierten Arm bereits eine hohe Inhibition zeigte. Da allerdings die Potenz des Komplexes mit drei modifizierten Armen am größten war, konnte auch der Nutzen der trigonalen Ausrichtung der Glykoliganden auf die drei Bindungstaschen des Hämagglutinins demonstriert werden, wobei die Unterschiede zwischen den Komplexen mit einem, zwei oder drei modifizierten Armen valenzkorrigiert eher gering ausfielen.

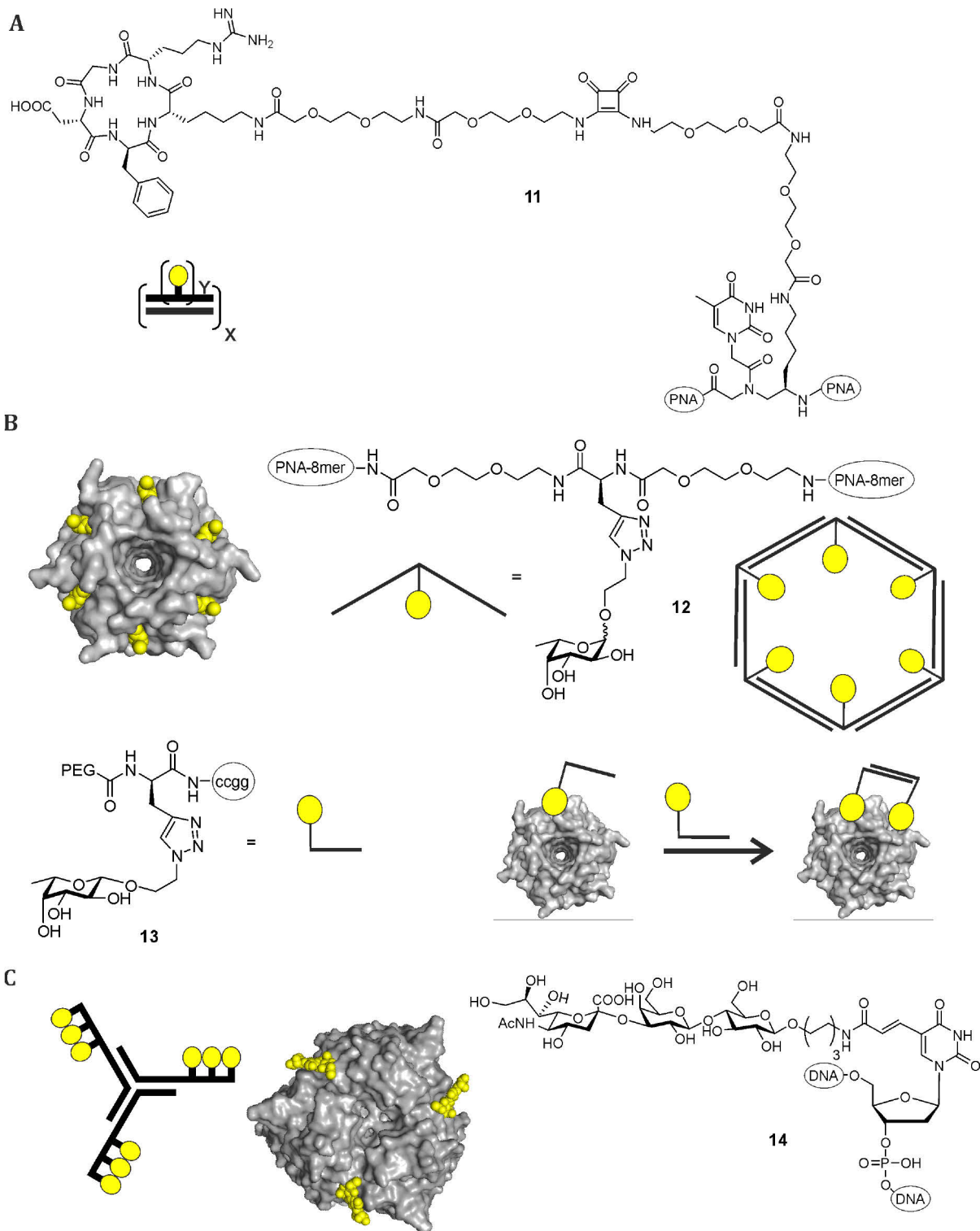


Abbildung 7: Nukleinsäurebasierte Gerüste zur Untersuchung von Lektinen. (A) c(RGDfK)-konjugierte $^1\text{K}_\gamma$ -PNA nach Appella *et al.*^[18] zum Aufbau multivalenter PNA·DNA-Komplexe. Höchste *in vivo* und *in vitro* Inhibition der Bindung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen wurde für $Y = 3$ und $X = 5$ erzielt. (B) Oben: Röntgenkristallstruktur des *Ralstonia solanacearum* Lektin in Komplex mit α -Methyl-L-Fucose (gelb) (2BT9.pdb). Benachbarte Bindestellen liegen jeweils etwa 20 Å voneinander entfernt. PNA-Fucose-Konjugate zur beidseitigen Hybridisierung mit anderen Konjugaten erlauben die Assemblierung von hexavalenten Komplexen, die der Geometrie des *Ralstonia solanacearum* Lektin nachempfunden wurden. Unten: PNA-Fucose-Konjugate, die aufgrund nur kurzer PNA-Bereiche

erst in Gegenwart des Lektins zu dimeren Komplexen assemblieren. (C) 2,3-Sialyllactose (gelb) modifizierte DNA-3-Wege-Kreuzung von *Ebara et al.*^[103] zur multivalenten Inhibition von Hämagglutinin-Trimeren auf Influenza A (H1N1)-Viren (4hmg.pdb).

3. Zielsetzung

Das Hämagglutinin auf Influenza A-Viren und dessen multivalente Wechselwirkung mit den Glykanen der Wirtszelle stellt einen Schlüsselschritt im viralen Replikationszyklus dar (Abbildung 8 A und B). Dieser Vorgang steht am Anfang einer Grippe und kann schwerwiegende gesundheitliche Konsequenzen für den Wirt haben. Die Blockierung des viralen Oberflächenproteins durch multivalente Verbindungen stellt eine attraktive Alternative zu herkömmlichen antiviralen Behandlungsmethoden dar. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob ein hochpotenter HA-Binder auf Basis eines Glyko-Nukleinsäuregerüsts entwickelt werden kann. Hierzu werden zunächst über eine DNA-programmierte räumliche Rasterung des viralen Rezeptors die Kriterien für eine effektive bivalente Wechselwirkung identifiziert, um anschließend durch Oligomerisierung des optimierten bivalenten Binders zu hochpotenten Verbindungen zu gelangen.

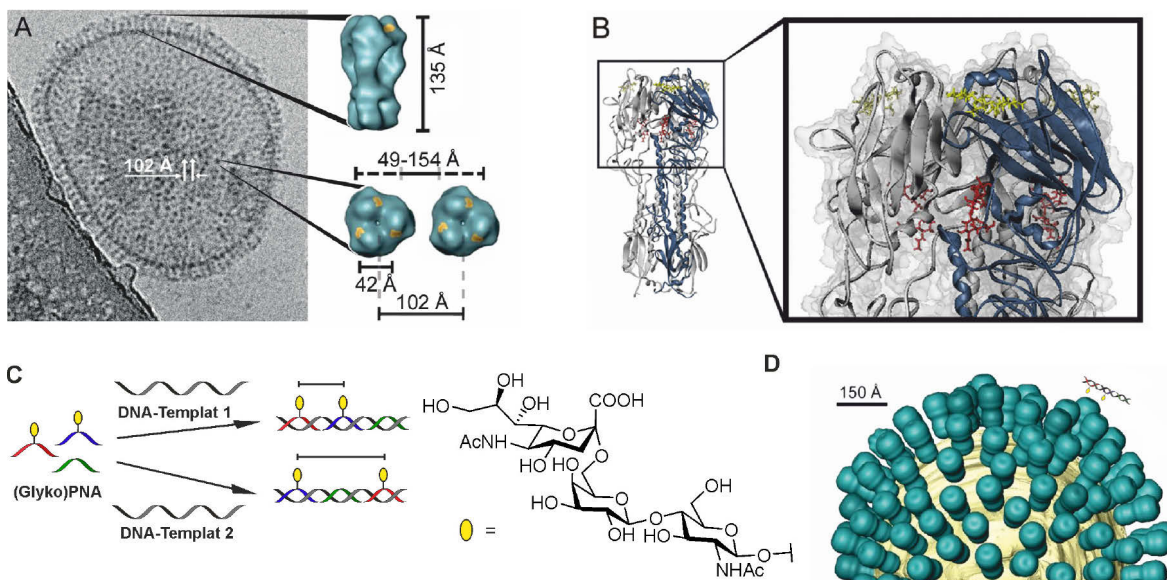


Abbildung 8: (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des humanen Influenza A-Virus (X31) mit trimeren Hämagglutininen (HA) auf der viralen Oberfläche. Die Darstellungen der HA zeigen die kanonischen Kohlenhydratbindungsstellen in gelb. Die 42 Å zwischen den kanonischen Bindungsstellen eines Trimers beziehen sich auf die euklidische Distanz und vernachlässigen die Undurchdringlichkeit der Proteinoberfläche. (B) Röntgenkristallstruktur (1HGG.pdb) des HA-Trimers (ein Monomer ist blau dargestellt) mit gebundenen Sialinsäure-Liganden (gelb, gebunden an die kanonischen Bindungsstellen; rot, gebunden an potentielle sekundäre Bindungsstellen). (C) Hybridisierung modifizierter (blau, rot) und unmodifizierter (grün) Peptidnukleinsäure- (PNA)-Oligomere mit DNA-Templaten führt zu bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen mit definierten Trisaccharid-Trisaccharid-Abständen. (D) Schematische, aber maßstabsgetreue Darstellung der HA-Trimere auf der viralen Oberfläche. Aufgrund der unbekannten Orientierung der HA-Trimere wurden die HA-Oberflächendarstellungen gemittelt. Zur Illustration wurde ein bivalenter PNA-DNA-Duplex gezeigt. Die Abbildungen A-D wurden mit Erlaubnis der *American Chemical Society* verwendet.^[104]

Zur Inhibierung des viralen Hämagglutinins wurde bereits eine Vielzahl multivalenter Glykokonjugate auf Grundlage von Polymeren,^[73-77, 105-107] Dendrimeren^[84-86] und Nanopartikeln^[79-82] vorgestellt, die zum Teil beeindruckende Affinitäten zeigten. Eine geringe Selektivität und damit einhergehende Toxizität, könnte jedoch den Einsatz dieser Verbindungen in der klinischen Anwendung verhindern. Zudem liefern derartige Ansätze häufig nur wenig Informationen über die optimalen Bedingungen für effektive multivalente Inhibition. Viele der teuren Glykoliganden könnten redundant sein oder sogar eine effektivere Anbindung verhindern. Ligandenökonomische Inhibition kann mithilfe von maßgeschneiderten Gerüsten erhalten werden, die sich den topologischen Gegebenheiten des Rezeptors perfekt anpassen können, jedoch häufig auf *in silico* Modellierungen basieren. Aber nicht immer sind die dafür notwendigen Informationen verfügbar. Das in dieser Arbeit verfolgte Konzept kommt ohne diese Vorkenntnisse aus, da der virale Rezeptor zunächst charakterisiert und die Bedingungen für effektive Inhibition abgeleitet werden. Dabei stellt die chelatisierende Verbrückung der relativ großen Bindungsabstände von über 40 Å eine Herausforderung dar. In der Theorie sollte ein rigider Binder, der die Liganden entsprechend den Bindungsstellen des Rezeptors separiert, höchste Affinitäten zeigen. Optimale Abstände sind aber schwer zu realisieren. Daher werden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Gerüste verwendet, i) Nukleinsäuregerüste und ii) Polyethylenglykole (PEG). PEG-basierte Gerüste kommen sehr häufig im Bereich der Multivalenz zur Anwendung und zeichnen sich durch eine ausgeprägte konformationale Flexibilität aus. Im Gegensatz dazu ermöglichen Nukleinsäuregerüste rigide Architekturen, auf denen Liganden kontrolliert angeordnet und dank der DNA-Selbstassemblierung in verschiedenen Abständen präsentiert werden können (Abbildung 8 C und D).^[16-26, 29] Als Ligand wird das Trisaccharid α 2,6-Sialyl-*N*-Acetylactosamin (Sialyl-LacNAc), welches als natürlicher Ligand auf den Glykanen humaner Epithelzellen vorkommt^[47, 108-109], synthetisiert und anschließend an die PEG-Polymere, bzw. die PNA-Oligomere ligiert. Im Fall der Nukleinsäurekomplexe werden verschiedene PNA-Trisaccharid-Konjugate hergestellt. In einem modularen Ansatz werden diese durch DNA-codierte Hybridisierung arrangiert und unter Verwendung verschiedener DNA-Template eine Vielzahl von Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexen erhalten.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Herrmann (HU Berlin) werden die Wechselwirkungen zwischen den hergestellten Verbindungen und IAVen mittels mikroskaliger Thermophorese und einem Hämagglutinationstest quantifiziert. Aus den erhaltenen Abstand-Affinität-Beziehungen könnte der Abstand der kanonischen Bindungsstellen in Lösung abgeleitet werden (Abbildung 9 A). Darüber hinaus sollte es mit dem verwendeten Präzisionsgerüst möglich sein, auch potentielle sekundäre Bindungsstellen zu identifizieren.^[22, 98-100, 110]

Auf der viralen Oberfläche der A/X31-Viren liegen die HA-Trimere in einem mittleren Abstand von 102 Å sehr dichtgepackt vor. Obwohl mechanistische Betrachtungen aufgrund der Komplexität der vorliegenden Wechselwirkungen schwierig sind, sollten in einem idealen Szenario, Aussagen darüber möglich sein, ob zwei Bindungstaschen eines Trimers oder zwei benachbarte Trimere auf der viralen Oberfläche verbrückt werden. Unterstützend wird hierzu in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Netz (FU Berlin) eine Analyse mithilfe von Polymermodellen der statistischen Mechanik durchgeführt.

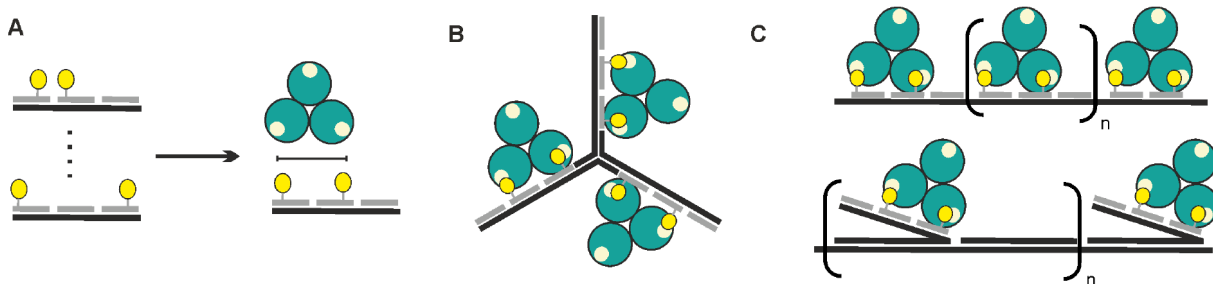


Abbildung 9: 2-stufiges Konzept zur Entwicklung hochpotenter Inhibitoren des Influenza A-Virus (X31). (A) Zunächst werden die Influenza-Viren einer DNA-programmierten räumlichen Rasterung unterzogen. Der optimale bivalente Binder soll anschließend vielfach auf komplexeren DNA-Strukturen, wie (B) DNA-3-Wege-Kreuzungen sowie (C) linearen (oben) und verzweigten (unten) Komplexen auf Tandem-DNA-Templaten, präsentiert werden, wobei die Wechselwirkung mit vielen Hämagglutininen auf der viralen Oberfläche zu hochaffinen Verbindungen führen könnte. Grau: PNA, schwarz: DNA, gelb: Sialyl-LacNAc-Ligand.

Neben einer hohen Bindungsaffinität wird das multivalente Wirkungsprinzip in der Natur auch zur Generierung von spezifischen Interaktionen genutzt. Daher werden ausgewählte Komplexe auf ihre Spezifität gegenüber verschiedenen viralen Serotypen untersucht.

Abschließend werden die aus der räumlichen Rasterung des Hämagglutinins gewonnenen Erkenntnisse für das rationale Design komplexer DNA-Strukturen verwendet, auf denen der optimierte bivalente Binder vielfach präsentiert werden soll. Hierzu wird die multiple Präsentation auf einer DNA-3-Wege-Kreuzung sowie linearen und verzweigten DNA-Tandem-Sequenzen untersucht, was aufgrund der Überbrückung mehrerer HA-Trimere auf der viralen Oberfläche zu hochaffinen Interaktionen führen soll (Abbildung 9 B und C). Die repetitiven DNA-Template sollen mittels Rolling-Circle-Amplifikation (RCA) bereitgestellt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung molekularer Lineale für das virale Hämagglutinin auf Basis von PNA·DNA- und Polyethylenglykol-Gerüsten

Zur Anbringung von Glykoliganden an multivalente Gerüststrukturen steht ein umfangreiches Repertoire an chemoselektiven Verknüpfungsmethoden zur Verfügung.^[111] Da sich in dieser Arbeit für die Anwendung der Thiol-Maleimidligation entschieden wurde, mussten zunächst thiomodi- fizierte Synthesebausteine in die PEG-Polymere und PNA-Oligomere eingefügt (Abbildung 10 A und B, grün) und ein Glyko-Maleimid (Abbildung 10 A und B, blau) hergestellt werden. Im Fall der Peptidnukleinsäuren (PNA) sollte ein von *Scheibe et al.*^[22] vorgestelltes thioalkyliertes PNA-Mono- mer verwendet werden.

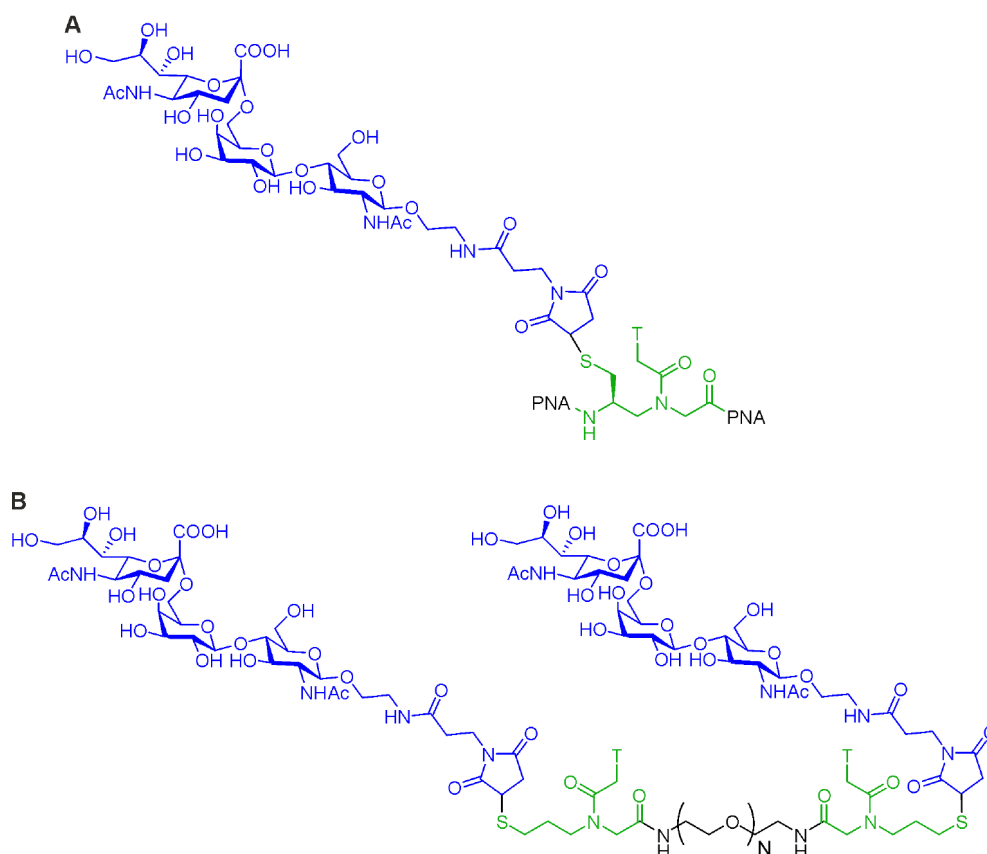


Abbildung 10: (A) Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugat, in dem ein thioalkyliertes PNA-Monomer (grün) während der Festphasenpeptidsynthese in die PNA-Sequenz eingefügt wurde, woran über Thiol-Maleimid-Knüpfung ein Maleimido-Sialyl-LacNAc (blau) ligiert wurde. Die Hybridisierung zweier Trisaccharid-PNA-Konjugate auf einem DNA-Templat führt zu bivalenten PNA·DNA-Duplexen (nicht gezeigt). (B) Bivalentes Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugat bestehend aus einem PEG-Rückgrat (schwarz) und zwei thiolhaltigen Synthesebausteinen (grün), woran jeweils Maleimido-Sialyl-LacNAc (blau) ligiert wurde. T = Thymin.

Das thioalkylierte PNA-Monomer soll während der PNA-Festphasensynthese in die Sequenz eines PNA-Oligomers eingefügt werden, um daran den Glykoliganden sequenzspezifisch an die thiomodifizierte Stelle ligieren zu können. Davon inspiriert, wird für die PEG-Polymere ein ähnlicher Baustein verwendet, bei dem auf die nicht benötigte Aminofunktion des *N*-(2-Aminoethyl)glycine-Rückgrats verzichtet wird. Das Trisaccharid soll, ausgehend von einem in der Literatur beschriebenen, an der C1-Position modifizierten *N*-Acetylglucosamin^[22, 112], in zwei chemoenzymatischen Glykosylierungen aufgebaut werden. Daraufhin wird der Maleimido-Linker nach Deblockierung der Aminofunktion des Aglykons eingeführt.

4.1.1 Synthese des Sialyl-LacNAc-Liganden

Die Synthese von komplexen Sacchariden und deren Modifikation stellt eine Herausforderung im Rahmen der konventionellen synthetischen Chemie dar. Auch wenn deren Totalsynthese in der Vergangenheit beeindruckend gelang, sind dafür erhebliche synthetische Anstrengungen notwendig.^[113-114] Diesbezüglich stellen chemoenzymatische Glykosylierungen eine attraktive Alternative dar, die sich durch eine bemerkenswerte Regio- und Stereoselektivität, Vermeidung umfangreicher Schutzgruppentechnik und durch hohe Syntheseausbeuten unter milden Bedingungen, auszeichnet.^[115]

Ausgangspunkt der Ligandensynthese ist Glucosamin-Hydrochlorid, das in einer achtstufigen Synthese, welche in der Literatur^[22, 112, 116] bereits ausführlich beschrieben wurde, zum *N*-Acetylglucosamin-Derivat **15** umgesetzt wurde (Synthese nicht gezeigt). In einer chemoenzymatischen Reaktion sollte zunächst das Disaccharid LacNAc **16** hergestellt werden (Abbildung 11A). Hierfür wurde der Glycosyl-Akzeptor Uridin-5'-dispho- α -D-galactose (UDP-Gal) benötigt, welcher in einer zweistufigen Synthese hergestellt wurde.^[117-118] Die Umsetzung des modifizierten *N*-Acetylglucosamins **15** mit UDP-Gal erfolgte unter literaturbekannten Bedingungen (Abbildung 11A).^[116] Katalysiert wurde diese Reaktion durch die kommerziell erhältliche β 1,4-Galactosyltransferase (GalTase). UDP-Gal wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Monosaccharids **15** portionsweise zur Reaktionsmischung hinzugegeben. Weiterhin wurde dem Reaktionsansatz die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) hinzugefügt, welche Nukleosidphosphate abbaut und somit einer Inhibition der Reaktion entgegenwirken sollte.^[119] Potentielle Nukleosidphosphate waren das Uridin-5'-monophosphat, welches als Verunreinigung aus der Synthese der UDP-Gal vorkommt sowie UDP, welches durch Umsetzung von UDP-Gal freigesetzt wird. Für die enzymatische Aktivität der GalTase wurden zudem Mangan(II)-Ionen in Form von Mangan(II)-chlorid bereitgestellt.^[120] Der Reaktionsverlauf wurde mittels *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC)-UV-Massenspektrometrie (MS)-Analyse verfolgt.

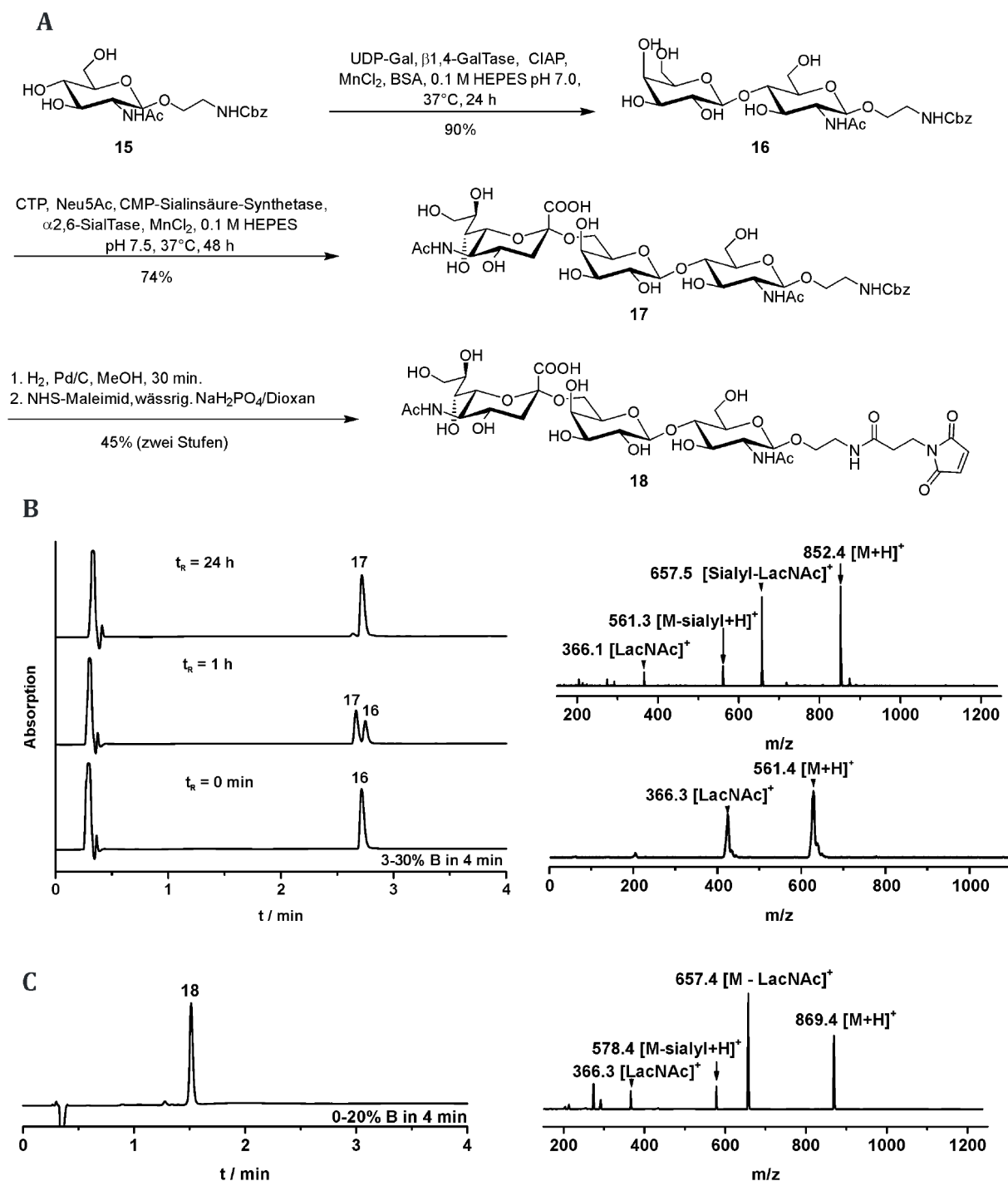


Abbildung 11: Chemoenzymatische Synthese von Sialyl-LacNAc **17** und Modifizierung mit einem Maleimid-Linker zu **18**: (A) Reaktionsschema; (B) UPLC-UV-Analyse des zeitlichen Verlaufs der enzymatischen Sialylierung und Elektrosprayionisation (ESI)-MS-Spektren von LacNAc **16** und Sialyl-LacNAc **17**; (C) UPLC-UV-Analyse und ESI-MS-Spektrum des gereinigten Maleimid-modifizierten Sialyl-LacNAc **18**. Bedingungen: Laufmittel A: H₂O/ MeCN/ Trifluoressigsäure (TFA) (98.9/1/0.1, v/v/v), Laufmittel B: MeCN / H₂O / TFA (98.9/1/0.1, v/v/v), Wellenlänge: 210 nm.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnte ein vollständiger Umsatz des *N*-Acetylglucosamins **15** verzeichnet werden. Die geringe Polarität der Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Schutzgruppe begünstigte die Aufreinigung durch Umkehrphasenchromatographie mittels *Sep-Pak*[®]-C18-Säule. Das Disaccharid LacNAc **16** wurde mit einer Ausbeute von 90% isoliert.

Im folgenden Reaktionsschritt wurde eine Sialinsäure an das Disaccharid **16** gekuppelt (Abbildung 11A). Enzyme, die den Transfer einer Sialinsäuregruppe von einer Cytidinmonophosphat (CMP)-Sialinsäure auf einen Akzeptor katalysieren, werden als Sialyltransferasen (SialTase) bezeichnet. In dieser Reaktion wurde die α 2,6-Sialyltransferase (SialTase) verwendet, welche aus dem *Photobacterium damsela* stammt. Das benötigte Substrat Cytidin-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) wurde mittels CMP-Sialinsäure-Synthetase aus Neu5Ac und Cytidin-5'-triphosphat (CTP) *in situ* erzeugt. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit erfolgte die Zugabe der α 2,6-SialTase. Nach 24 Stunden wurde der Reaktionsfortschritt mittels UPLC-UV-MS-Analyse untersucht (Abbildung 11B). Bei unvollständigem Umsatz des Disaccharids **16** wurden erneut CTP, Neu5Ac und CTP-Sialinsäure-Synthetase zugesetzt. Obwohl Cytidin-Nukleotide, die bei dieser Reaktion als Nebenprodukte auftreten, potente Sialyltransferase-Inhibitoren darstellen,^[121-122] konnte häufig ein nahezu vollständiger Umsatz zum Sialyl-LacNAc **17** verzeichnet werden. In diesem Fall wurde das Rohprodukt durch Umkehrphasenchromatographie mittels *Sep-Pak*[®]-C18-Säule gereinigt und direkt im nächsten Reaktionsschritt verwendet. Bei unvollständigem Umsatz wurde vorhandenes Disaccharid **16** vom Rohprodukt mittels präparativer HPLC getrennt. In Gegenwart der im Laufmittel enthaltenen Trifluoressigsäure (TFA) (0.1%) wurde Hydrolyse der α 2,6-glykosidischen Bindung beobachtet. Um diese zu verhindern, erfolgte zunächst ein Lösungsmittelaustausch auf einer *Sep-Pak*[®]-C18-Säule, bevor das gereinigte Produkt lyophilisiert wurde. Das Trisaccharid **17** konnte mit einer Ausbeute von 74% isoliert werden.

Im folgenden Reaktionsschritt wurde die Aminofunktion des Trisaccharids **17** deblockiert. Bei der Palladium-katalysierten hydrogenolytischen Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe, konnten vereinzelt Nebenprodukte detektiert werden, die Massendifferenzen von [M+14] und [M+28] aufwiesen. Diese in der Literatur^[123] bereits beschriebenen Nebenreaktionen konnten auf eine einfache, beziehungsweise doppelte Methylierung der Aminofunktion zurückgeführt werden. Längere Entgasungszeiten, gründliches Spülen mit Argon sowie eine Verkürzung der Reaktionszeit auf 30 Minuten, verhinderte die unerwünschten Methylierungen weitestgehend. Der vollständige Umsatz der Ausgangsverbindung **17** wurde mittels UPLC-UV-MS-Analyse überprüft und das Rohprodukt nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels direkt weiterverwendet.

Scheibe et al.^[122] konnten bereits die Ligation eines LacNAc-Maleimids an thioalkylierte PNA-Oligomere demonstrieren. Hierzu werden zunächst *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Aktivester von Maleimiden benötigt. *Song et al.*^[124] beschrieben die Eintopfsynthese von Maleimid-NHS-Estern mit hohen Ausbeuten unter Einsatz von Malonsäureanhydrid, β -Alanin, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und NHS. In dieser Arbeit wurde der NHS-Aktivester der 3-Maleimidopropansäure synthetisiert und anschließend mit dem deblockierten Sialyl-LacNAc unter Ausbildung einer Amidbindung umgesetzt (Abbildung 11A). Die Reaktion verlief im wässrigen Phosphat-Puffer, wobei der Maleimid-NHS-Ester zunächst in Dioxan gelöst werden musste. Unter physiologischen Bedingungen besitzen NHS-Ester eine Halbwertszeit von nur wenigen Stunden, welche im basischen Milieu (pH>7.5) rasch absinkt.^[125] Die Reaktion wurde bei pH 6.5 durchgeführt um noch eine ausreichend hohe Reaktivität des primären Amins zu gewährleisten und um eine Hydrolyse des NHS-Esters und des Maleimids zu verhindern. Der Fortschritt der Reaktion wurde halbstündlich mittels UPLC-UV-MS-Analyse überprüft und Maleimid-NHS-Ester hinzugegeben, bis kein primäres Amin mehr detektiert werden konnte. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte nach Entfernung des Dioxans am Vakuum-Zentrifugalverdampfer (SpeedVac) mittels semi-präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit anschließendem Lösungsmittelaustausch über eine *Sep-Pak*® C18-Säule. Das Maleimid-modifizierte Sialyl-LacNAc **18** wurde in einer Ausbeute von 45% (über zwei Stufen) hergestellt und bis zur Ligation an thioalkylierte PNA-Oligomere oder thiohaltige PEG-Polymere in lyophilisierter Form bei -20°C gelagert.

4.1.2 Herstellung von Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen

4.1.2.1 Automatisierte Festphasensynthese von PNA-Oligomeren

Um Liganden an eine definierte Position innerhalb einer PNA-Sequenz zu platzieren, sind modifizierte PNA-Monomere geeignet, die zunächst während der automatisierten PNA-Synthese in die PNA-Oligomere eingebaut werden und woran im Anschluss die Liganden zielgenau ligiert werden können. Hierzu hat sich die Verwendung eines PNA-Monomerrückgrats mit Mercaptomethylseitenkette bewährt. *Scheibe et al.*^[22] demonstrierten die Synthese und Anwendung des thiolmodifizierten PNA-Monomers **19** in der automatisierten PNA-Festphasensynthese nach 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/ Benzhydryloxycarbonyl (Bhoc)-Strategie. Ausgangspunkt für die fünfstufige Synthese von **19** ist kommerziell erhältliches Fmoc- und Triphenylmethyl (Trt)-geschütztes (*R*)-Cystein. Das PNA-Monomer **19** zeichnet sich durch ein charakteristisches *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Rückgrat aus, dessen Thiofunktion und primäres Amin blockiert wurden, um dessen Einsatz in der Festphasensynthese zu ermöglichen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten PNA-Oligomere wurden in einer automatisierten Synthese an fester Phase nach Fmoc/ Bhoc-Strategie hergestellt.^[126] Als feste Phase diente das Fmoc-geschützte Rinkamid-Harz Tenta® R RAM. Zur Erhöhung der Löslichkeit der PNA-Oligomere in polaren Lösungsmitteln wurde das Trägermaterial zunächst mit der kationischen Aminosäure Lysin beladen.^[127] Alle nachfolgenden Kupplungen der kommerziell erhältlichen PNA-Monomere sowie des thioalkylierten PNA-Monomers **19** erfolgten nach den gleichen sich wiederholenden Syntheseschritten (Abbildung 12). Zu Beginn wurde stets der Fmoc-geschützte *N*-Terminus durch Behandlung mit Piperidin (20% in *N,N*-Dimethylformamid (DMF)) deblockiert. Im Anschluss wurde die Carboxylfunktion des PNA-Monomers mit (2-(6-Chlor-1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat (HCTU) und *N*-Methylmorpholin (NMM) voraktiviert und zum Harz gegeben. Ein Syntheszyklus endete mit der Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen mittels einer Lösung von Essigsäureanhydrid (Ac_2O) und 2,6-Lutidin in DMF. Die Kupplungen der Aminosäure und PNA-Monomere wurden doppelt vorgenommen. Nach Durchlauf aller Syntheszyklen wurde die terminale Aminofunktion deblockiert, das Harz gewaschen und getrocknet. Die Abspaltung vom festen Träger wurde in Gegenwart von TFA vorgenommen. Im Fall von thiolmodifizierten PNA-Sequenzen wurde der Abspaltlösung neben Triisopropylsilan und Wasser auch 1,2-Ethandithiol (EDT) zugesetzt, welches einer möglichen Dimerisierung durch Ausbildung von Disulfidbindungen entgegenwirken sollte. Im Fall von unmodifizierten PNA-Sequenzen enthielt die Abspaltlösung TFA, Triisopropylsilan, Wasser und *m*-Kresol. Insgesamt wurden sechs PNA-Oligomere in Ausbeuten von 7–15 % hergestellt. Ein PNA-Oligomer lag unmodifiziert vor und in fünf

PNA-Oligomeren wurde das thioalkylierte PNA-Monomer **19** an den Positionen 3, 4 (2x), 6 und 9 eingebaut, welche anschließend zur Anbringung der Ligand-Maleimide dienen sollten.

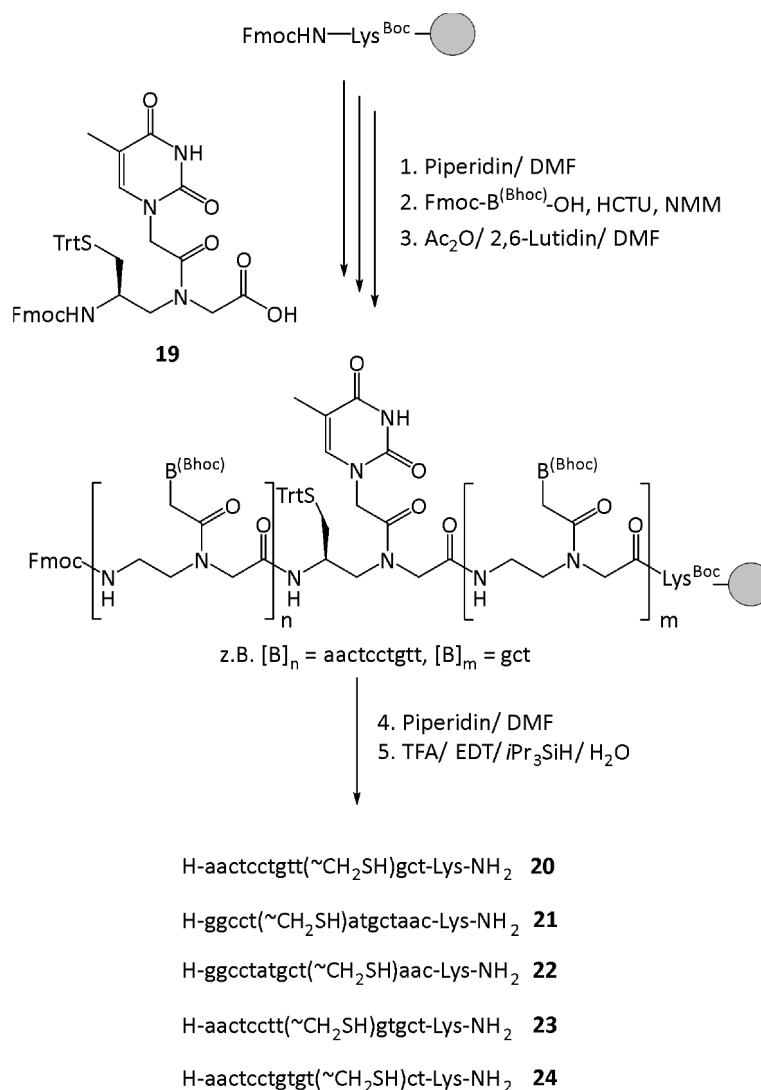


Abbildung 12: Automatisierte Festphasensynthese der thioalkylierten PNA-Oligomere **20-24** nach Fmoc/Bhoc-Strategie (B = Nukleobasen Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin; Boc = *tertiär*-Butyloxycarbonyl; Trt = Trityl).

4.1.2.2 Synthese von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten

In den vorherigen Kapiteln wurde bereits beschrieben, wie der Maleimido-Sialyl-LacNAc-Ligand **18** und die thioalkylierten PNA-Oligomere **20-24** hergestellt wurden. Das Trisaccharid **18** (2 Äquivalente, 5 – 20 mM in Wasser) wurde nun an die PNA-Oligomere **20-24** (1 Äquivalent, 350 – 1000 μ M in Wasser; Ansatzgröße: 100 – 300 nmol) mittels Thiol-Maleimid-Kupplungen ligiert (Abbildung 13A). Hierbei erfolgte die Reaktion in einem wässrigen Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (10 mM, PNA-Konzentration: 100 μ M) bei einem pH-Wert von 6.5. Unter diesen Bedingungen zeigte sich das Maleimid **18** über mehrere Stunden gegen Hydrolyse stabil und die Thiolgruppe ausreichend reaktiv für eine Addition an das Maleimid in **18**. Verbindung **18** wurde sukzessive zum Reaktionsansatz hinzugefügt und reagierte jeweils rasch binnen weniger Minuten. Die Zugabe erfolgte bis mittels UPLC-UV-MS-Analyse der vollständige Umsatz des thioalkylierten PNA-Oligomers zum Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugat (**PNA2-PNA6**) festgestellt werden konnte (Abbildung 13B). Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte durch präparative HPLC. Aufgrund der Säureempfindlichkeit des Trisaccharides wurde erneut ein Lösungsmittelaustausch mittels Umkehrphasenchromatographie an einer *Sep-Pak* C18-Säule durchgeführt. Das Produkt konnte anschließend in Ausbeuten von 50 – 90% isoliert werden. Auf diese Weise konnten fünf PNA-Oligomere hergestellt werden, die an den Positionen 3, 4 (2x), 6 oder 9 mit Sialyl-LacNAc-Einheiten modifiziert vorlagen.

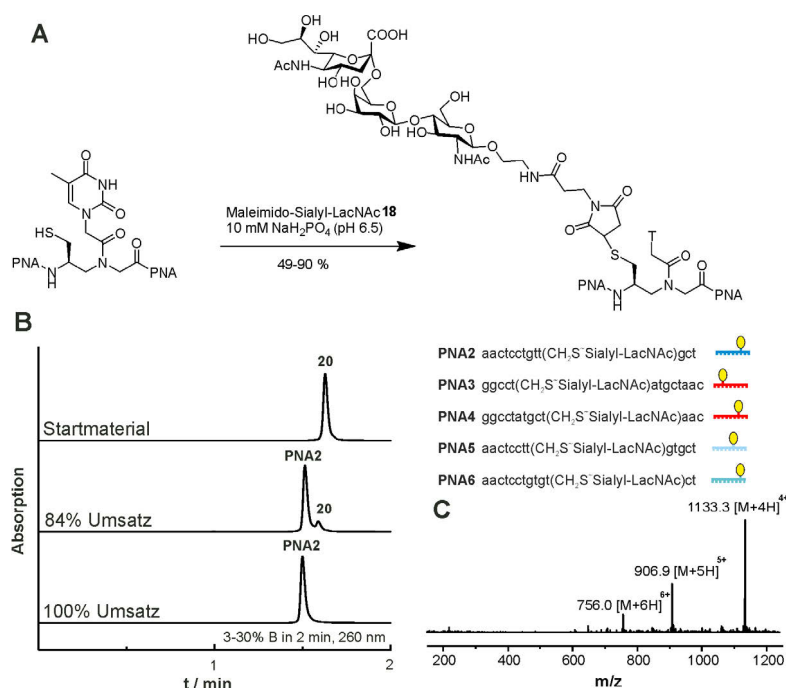


Abbildung 13: Synthese von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten. (A) Allgemeines Syntheschema, (B) Verfolgung der Reaktion mittels UPLC-UV-Analyse am Beispiel der Synthese von **PNA2**. Die Umsetzung von **18** und **20** zu **PNA2** erfolgt innerhalb von wenigen Minuten. (C) ESI-MS-Spektrum des gereinigten Produktes **PNA2**. T = Thyminrest.

4.1.2.3 Herstellung und Charakterisierung von Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen

Im vorhergehenden Kapitel 4.1.2.2 wurde die Synthese von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten beschrieben. Die fünf hergestellten Zucker-PNA-13mere (**PNA2-PNA6**) unterscheiden sich in ihrer Sequenz oder der Position ihrer Zucker-Funktionalität. Mithilfe eines DNA-Templates der Länge von 39 Nukleotiden sollte die Reihenfolge von bis zu drei verschiedenen PNA-Oligomeren kodiert werden. Unter Verwendung verschiedener DNA-Template sollten bivalente Komplexe erhalten werden, in denen die Sialyl-LacNAc-Einheiten entlang des PNA-DNA-Rückgrats durch verschiedene Nukleotidabstände n_{nt} , voneinander getrennt werden (Abbildung 14A und B). Auf Grundlage der helikalen Struktur des PNA-DNA-Duplex mit einem mittleren Basenabstand von 3.25 Å (Kapitel 2.3), kann die Distanz r_{ete} zwischen zwei Zucker-Einheiten mit $r_{ete} = (n_{nt} + 1) \cdot 3.25 \text{ Å}$ bestimmt werden.^[91] Dabei bezeichnet r_{ete} die End-zu-End-Distanz der Verbindung (engl. *end-to-end*). Unter Verwendung der fünf modifizierten PNA-Oligomere (**PNA2-PNA6**) und des unmodifizierten PNA-Oligomers **PNA1**, wurden bivalente Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe mit Abständen von 7 – 31 Nukleotiden ($\approx 23 - 101 \text{ Å}$) zwischen den Zuckern hergestellt (Abbildung 14C). Aufgrund der hohen Affinität von PNA für komplementäre DNA-Stränge, sollten PNA-13mere geeignet sein, um die Stabilität der PNA-DNA-Komplexe im submikromolaren Konzentrationsbereich zu gewährleisten. In Denaturierungsexperimenten zeigten alle untersuchten Komplexe eine ausreichend hohe Schmelztemperatur $>60^\circ\text{C}$ (Abbildung 14C und D). Da die einzelnen untersuchten Komplexe nur geringfügige Unterschiede in ihrer Schmelztemperatur aufwiesen, kann geschlussfolgert werden, dass die Stabilität der Duplexe weder von der Anbringung der Zucker-Liganden noch deren Positionierung entlang des Nukleinsäure-Rückgrats beeinflusst wird.

Aufgrund der helikalen Struktur von Nukleinsäureduplexen stehen die Liganden in definierten Winkeln zueinander. Jedoch liegen zwischen benachbarten PNA-13meren Einzelstrangbrüche vor, die für zusätzliche Rotationsfreiheitsgrade sorgen und Spiralisierungsspannung während der Wechselwirkung mit dem Zielprotein vermindern sollen.^[128] Auch der Linker, die Verbindung zwischen Ligand und Rückgrat, sollte bei ausreichender Länge und Flexibilität die Windung der Helix kompensieren.

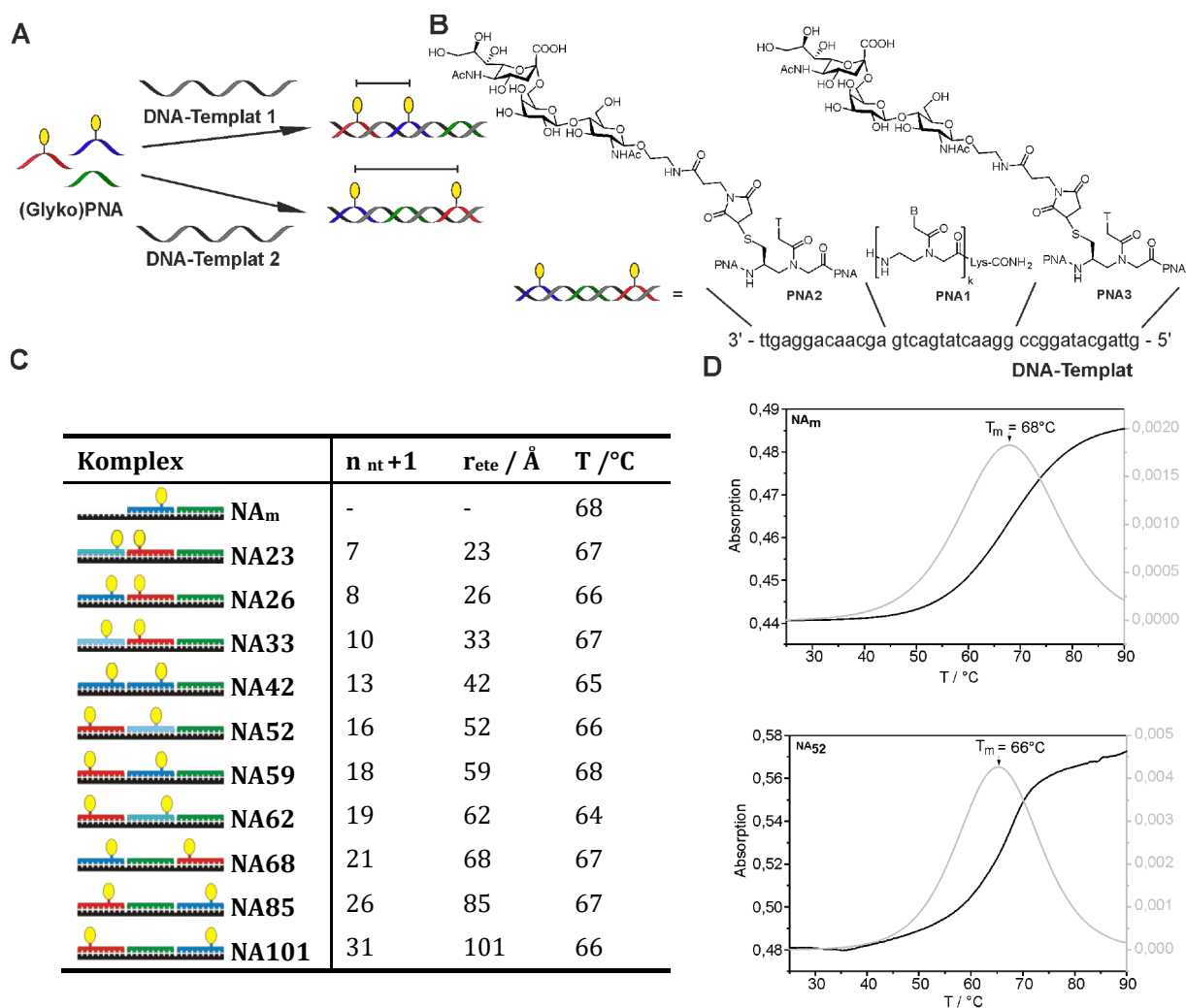
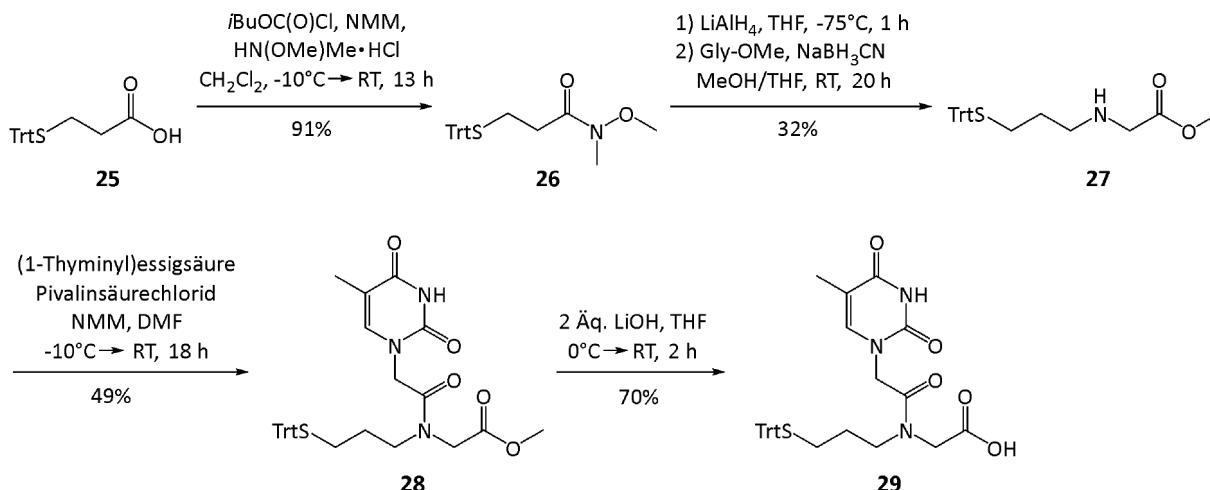


Abbildung 14: (A) Hybridisierung Trisaccharid-modifizierter (rot, blau) und unmodifizierter (grün) PNA-Oligomere mit DNA-Templaten (schwarz) führt zu bivalenten PNA·DNA-Duplexen mit definierten Zucker-Zucker-Abständen entlang des Nukleinsäure-Rückgrats. (B) Struktur eines bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Duplexes. (C) Untersuchung der Stabilität bivalenter Komplexe mittels Denaturierungsexperimenten. Die Absorption wurde bei 260 nm während eines Temperaturzyklus (3 Zyklen von 20-90°C in 0.5°C/min) bestimmt, die Wendepunkte berechnet und über alle Zyklen gemittelt. Bedingungen: 0.5 μM Komplex, 10 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0. (D) Die Schmelzkurven sind beispielgebend für einen bivalenten (**NA52**) und einen monovalenten (**NA_m**) PNA·DNA-Komplex gezeigt. Schwarze Linie: Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur, graue Linie: erste Ableitung.

4.1.3 Synthese von Sialyl-LacNAc-Polyethylenglykol-Konjugaten

Der Aufbau der Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugate erfolgte durch terminale Anknüpfung der *S*-Triphenylmethyl (Trityl)-Synthesebausteine **29** an kommerziell erhältliche PEG-Amine. Um die nähere strukturelle Umgebung des Trisaccharides geringstmöglich zu verändern und somit die Vergleichbarkeit mit den Nukleinsäure-Gerüsten weitestgehend zu gewährleisten, wurde die Struktur dieser Einheit dem thioalkylierten PNA-Monomer **19** nachempfunden.



Schema 1: Synthese des *S*-Trityl-geschützten Synthesebausteins **29** für die Modifikation von Polyethylenglykol-Aminen.

In einer fünfstufigen Synthese erfolgte zunächst die Überführung der *S*-Trityl-geschützten Mercaptopropansäure **25** in das entsprechende Weinrebamid **26**. Hierzu wurde die Carboxylgruppe von **25** mit Chlorameisensäureisobutylester als gemischtes Anhydrid aktiviert, mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin umgesetzt und das Weinrebamid **26** mit einer Ausbeute von 91% erhalten. Anschließend wurde mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert, nach wässriger Aufarbeitung mit Glycinmethylester und Natriumcyanoborhydrid reaktiv aminiert und **27** in einer Ausbeute von 32% (über zwei Stufen) hergestellt. Für den folgenden Schritt wurde zunächst (1-Thyminylessigsäure nach einer literaturbekannten Vorschrift aus Thymin und Bromessigsäure hergestellt.^[129] Diese wurde mit Pivalinsäurechlorid als gemischtes Anhydrid aktiviert und mit dem sekundären Amin **27** zu **28** umgesetzt. Eine basische Verseifung deblockierte die Carboxylgruppe und führte zur Zielverbindung **29**, die nun für die Umsetzung mit den PEG-Aminen bereitstand.

Für die Herstellung von bivalenten Glyko-PEG-Konjugaten wurden bifunktionalisierte PEG-Diamine als Ausgangsverbindungen verwendet. Dabei handelte es sich um ein monodisperses PEG-Diamin (N=27) und zwei polydisperse PEG-Diamine (N≈67 und 144), deren Polymerisationsgrad massenspektrometrisch bestimmt wurde. Im ersten Syntheseschritt wurden die Carboxylfunktio-

nen von **29** terminal unter Ausbildung einer Amidbindung an das PEG-Diamin gekuppelt (Abbildung 15A). Dafür wurde **29** zunächst mit *N*-Hydrosuccinimid (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC-HCl) voraktiviert, zum PEG-Diamin gegeben und über Nacht geschüttelt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels präparativer HPLC. Anschließend wurde die Thiolfunktion im Sauren deblockiert, mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

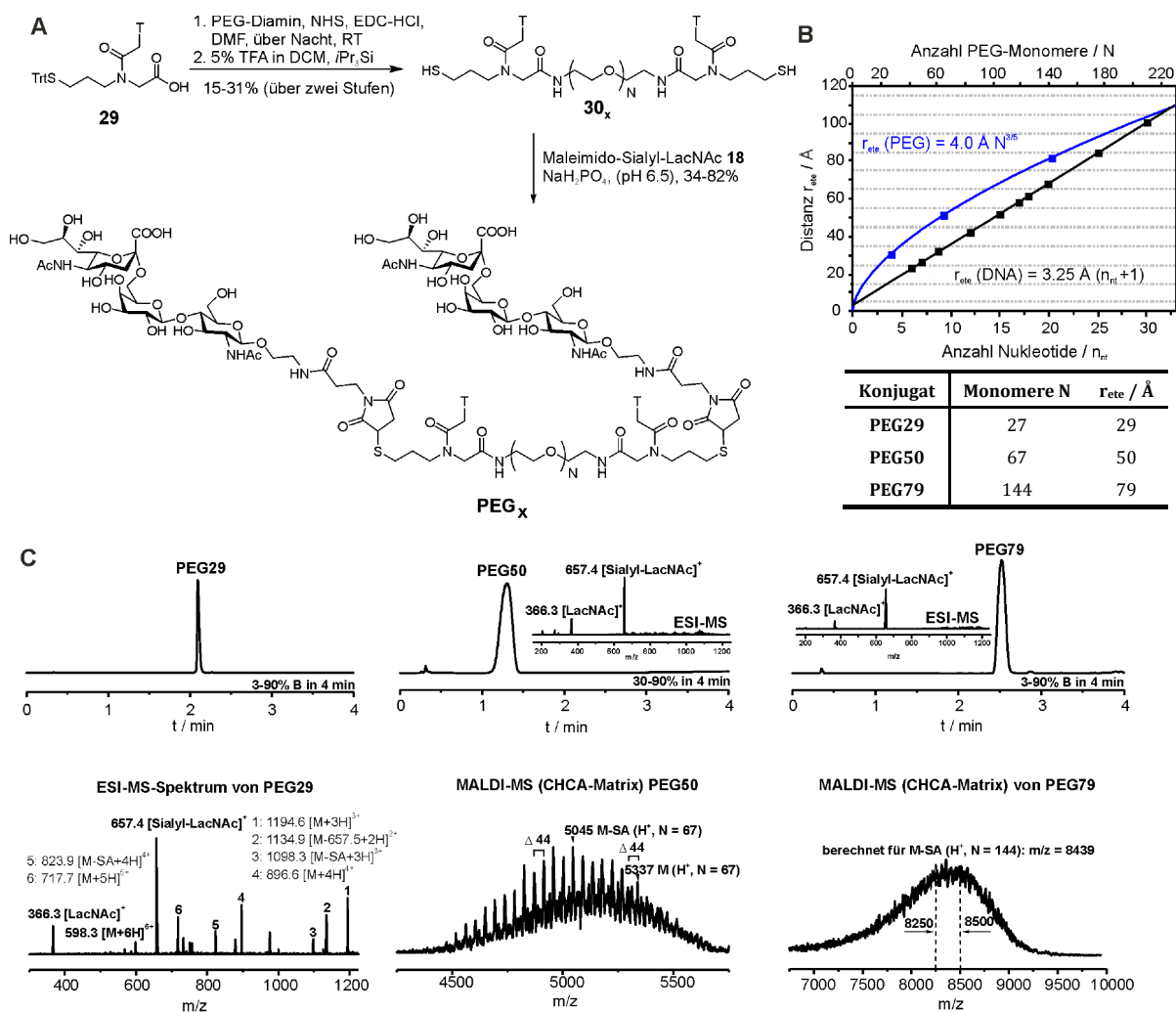


Abbildung 15: Synthese und Charakterisierung von bivalenten Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugaten. (A) Syntheseschema ($x = 29, 50$ oder 79); (B) Abhängigkeit der Distanz zwischen zwei Glykoliganden von der Anzahl der separierenden Monomere für PEG- und PNA-DNA-Gerüste. (C) UPLC-Chromatogramme bei 260 nm und massenspektrometrische Analyse der gereinigten bivalenten Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugate **PEG29**, **PEG50** und **PEG79**. T = Thyminrest.

Analog der Vorgehensweise bei den Glyko-PNA-Konjugaten erfolgte nun eine Thiol-Maleimid-Kupplung, bei der an die PEG-Dithiole **30_x** ($x = 29, 50, 79$) je zwei Sialyl-LacNAc-Liganden ligiert wurden. Hierbei wurde erneut sukzessive Maleimido-Sialyl-LacNAc **18** zum Reaktionsansatz gegeben, bis mittels UPLC-Analyse ein vollständiger Umsatz der Dithiole **30_x** verzeichnet werden konnte. Um die Integrität des Trisaccharids zu gewährleisten, erfolgte nach der präparativen HPLC

ein Lösungsmittelaustausch mittels Umkehrphasenchromatographie (SepPak-C18-Säule). Die bivalenten Glyko-PEG-Konjugate **PEG29**, **PEG50** und **PEG79** wurden mittels UPLC-UV- und massenspektrometrischer Analyse charakterisiert (Abbildung 15C). In den erhaltenen Massenspektren werden erneut die typischen Fragmentierungsmuster des Trisaccharids deutlich, wie sie bereits beim Maleimido-Trisaccharid **18** (Vgl. Abbildung 11C) beobachtet werden konnten.

Wie aus Lichtstreuungsexperimenten und atomistischen Simulationen bekannt ist, folgt der mittlere End-zu-End-Abstand r_{ete} von PEG-Polymeren dem Flory-Radius, mit $r_{\text{ete}} = a_F N^{3/5}$, wobei $a_F = 4.0 \text{ \AA}$ und N die Anzahl der PEG-Monomere beschreibt.^[130-131] Der inkrementelle Längenbeitrag pro PEG-Einheit sinkt mit wachsender Polymerlänge. Aus diesem Grund werden lange PEG-Ketten benötigt, um Glykoliganden über eine Distanz $>50 \text{ \AA}$ anzuordnen (Abbildung 15B). Wie aus der Struktur des PNA·DNA-Duplexes hervorgeht (Kapitel 2.3) besteht bei den PNA·DNA-Duplexen ein linearer Zusammenhang zwischen Polymerlänge und Anzahl der Nukleotide, sofern r_{ete} unterhalb der Persistenzlänge von etwa 500 \AA liegt.

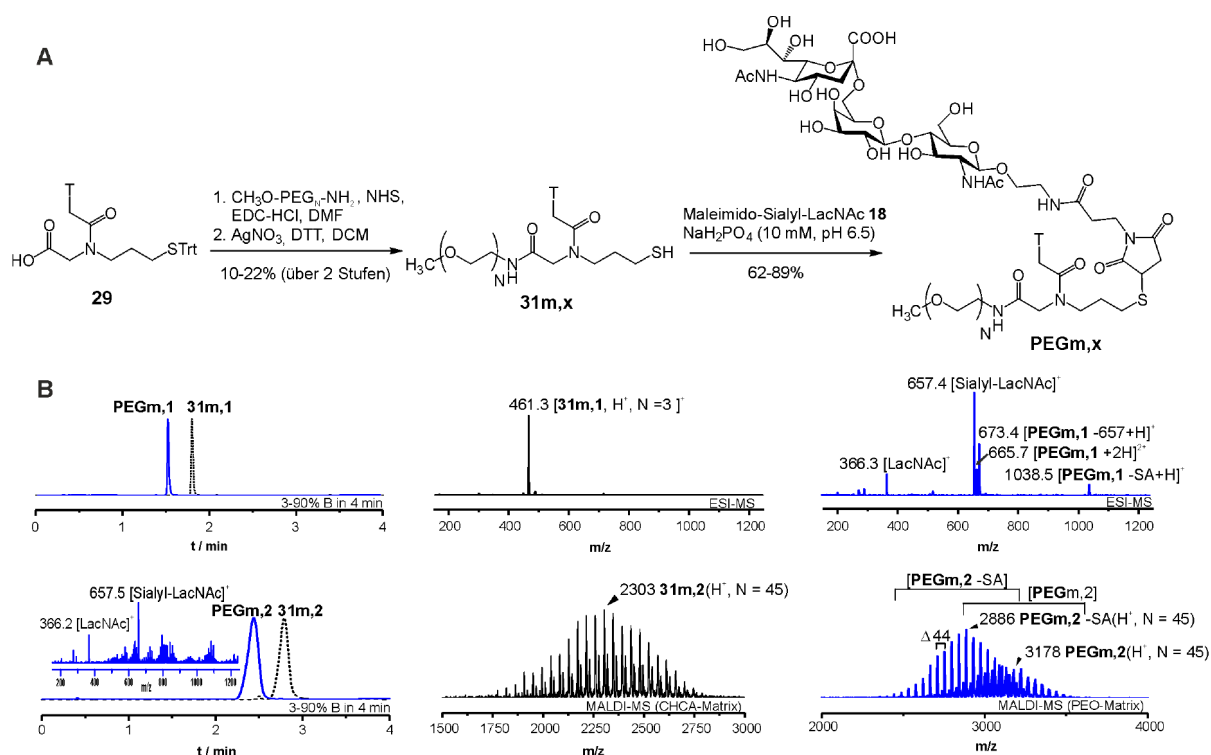


Abbildung 16: Synthese und Charakterisierung monovalenter Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugate **PEG_{m,x}** (**PEG_{m,1}** mit $N = 3$ und **PEG_{m,2}** mit $N \approx 45$). (A) Syntheschema; (B) UPLC-UV-Absorption (260 nm) der PEG-Thiole **31_{m,x}** (schwarz) und monovalenten Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugate **PEG_{m,x}** (blau) sowie deren ESI-MS- und Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)-MS-Spektren.

Als Referenzsubstanzen wurden zudem monovalente Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugate synthetisiert. Hierzu dienten folgende monofunktionalisierte Methoxy-Polyethylenglykolamine als Ausgangsverbindungen: ein kurzes monodisperses ($N = 3$) und ein längeres polydisperses PEG-Amin ($N \approx 45$). Die Synthese verläuft ähnlich der bereits bei den bivalenten PEG-Konjugaten verwendeten Strategie (Abbildung 16A). Zunächst wurde der *S*-Trityl-geschützte Synthesebaustein **29** terminal über eine Amidbindung an das PEG-Amin angefügt und anschließend die Thiolgruppe deblockiert. Hierzu wurde der *S*-Trityl-Ether unter Verwendung von Silbernitrat (AgNO_3) und Zugabe von Dithiothreitol (DTT) gespalten. Abschließend wurde Maleimido-Sialyl-LacNAc **18** mit dem deblockierten PEG-Thiol **31_{m,x}** umgesetzt. Erwartungsgemäß erfuhren die Thiole **31_{m,x}** nach Ligation der polaren Glykoliganden eine hydrophile Verschiebung, was in einer kürzeren Retentionszeit im UPLC-Chromatogramm resultierte (Abbildung 16B, links). Mittels massenspektrometrischer Analyse konnte die Identität der gewünschten Produkte nachgewiesen werden. Auch bei diesen Verbindungen konnte eine Fragmentierung der Glykoliganden in der MS-Analyse beobachtet werden.









4.2 Untersuchung der Wechselwirkungen von Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Duplexen und Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugaten mit Hämagglutininen auf viralen Partikeln











4.2.1 Räumliche Rasterung von löslichen Hämagglutinin-Trimeren

In dem Kapitel 4.1 wurde die Synthese und Charakterisierung von Glykokonjugaten auf Basis von PNA·DNA-Duplexen und Polyethylenglykolen besprochen. Im folgenden Kapitel soll zunächst deren Eignung für die räumliche Rasterung von löslichen Hämagglutininen des Influenza A-Virus (X31) verglichen werden. Die Bestimmung der Affinitäten wurde mittels mikroskaliger Thermophorese nach *Xiong et al.*^[132] durchgeführt. Das angewandte Messprinzip beruht auf der gerichteten Bewegung eines Analyten in einem Temperaturgradienten (Thermophorese), welche von der Größe, Ladung und Hydrathülle des Analytmoleküls abhängt und sich bei Bindung eines Liganden verändert. Die Thermophorese wird nach einer lokalen Erwärmung mittels eines Infrarotlasers optisch erfasst. Hierzu wird der Analyt fluoreszenzmarkiert. Nach Titration des Analyten mit dem Liganden können aus der Änderung der Thermophorese quantitative Aussagen zu Bindungsparametern der Analyt-Ligand-Wechselwirkung abgeleitet werden. Da die genauen Analyt-Ligand-Stöchiometrien bei multivalenten Systemen nicht bekannt sind, werden die ermittelten Affinitätskonstanten als apparente Dissoziationskonstanten ($K_{D, app}$) angegeben. Das lösliche HA (bHA) wurde durch Verdau der aufgereinigten Viren mit Bromelain gewonnen.^[133] Für die Messungen mittels mikroskaliger Thermophorese wurde das Trimer mit Alexa647 fluoreszenzmarkiert. Diese Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe Herrmann (HU Berlin) durchgeführt.

Um das Verfahren und die Integrität des bHA zu validieren wurden die Wechselwirkungen mit *N*-Cbz-geschütztem Sialyl-LacNAc **17** untersucht. Die erhaltene Dissoziationskonstante für **17** ($K_D = 3100 \pm 300 \mu M$) liegt in guter Übereinstimmung mit dem in der Literatur^[132] beschriebenen Wert ($K_D = 6100 \pm 200 \mu M$), der unter Verwendung von kommerziell erhältlichem $\alpha 2,6$ -Sialyl-LacNAc ermittelt wurde. Die Analyse der bivalenten Duplexe **NA23** – **NA101** zeigt eine bimodale Distanz-Affinitäts-Beziehung (Tabelle 1 und Abbildung 17A grüne Quadrate, Abbildung 17B links). Verhältnismäßig geringe Affinitäten wurden für Sialyl-LacNAc-Liganden bestimmt, die in einer Distanz $>68 \text{ \AA}$ präsentiert wurden. Eine ausgeprägte bivalente Verstärkung (106-fach gegenüber dem Trisaccharid und 30-fach gegenüber dem monovalenten PNA·DNA-Komplex **NA_m**) wurde beobachtet, als die zwei Glykoliganden 52 \AA getrennt voneinander vorlagen ($K_D = 29 \pm 5 \mu M$). In Kristallstrukturanalysen kann eine euklidische Distanz von 42 \AA zwischen den kanonischen Kohlenhydratbindungsstellen ermittelt werden (1HGG.pdb). Da die Bindungstaschen nicht entlang ei-

ner flachen Ebene angeordnet sind, muss das Gerüst jedoch länger sein, um die zwei Bindungsstellen miteinander zu verbinden. Durch Analyse möglicher Wege (Abbildung 17C blau, lila) zwischen zwei kanonischen Bindungsstellen entlang der Proteinoberfläche, konnten die Abstände zwischen zwei kanonischen Bindungsstellen auf 45 Å und 52 Å abgeschätzt werden. Daher sollte unter Berücksichtigung einer leicht konvexen Proteinoberfläche ein bivalenter Binder die Liganden in einem Abstand >45 Å anordnen, was in Übereinstimmung mit dem beobachteten Affinitätsmaximum bei 52 Å liegt.

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten von Sialyl-LacNAc, Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexen und Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugaten gegenüber löslichem Hämagglutinin bestimmt mittels mikroskaliger Thermophorese (MST). Die MST-Messungen wurden von Dr. Daniel Lauster (AK Herrmann, HU Berlin) durchgeführt. , , , ,  modifizierte PNA-Oligomere,  unmodifiziertes PNA-Oligomer,  DNA-Templat,  α 2,6-sialyl-LacNAc, n.b.= nicht bestimmbar.

Komplex	$r_{ete} / \text{\AA}$	$K_{D,app} / \mu\text{M}$ (bHA)	Bindungs- verstärkung
α 2,6-SLN 17	monovalent	3100±250	1
 NA _m	monovalent	863±67	3
 NA23	23	244±99	12
 NA26	26	208±18	14
 NA33	33	277±183	11
 NA42	42	187±15	16
 NA52	52	29±5	106
 NA59	59	104±11	29
 NA62	62	240±15	12
 NA68	68	543±79	5
 NA101	101	588±47	5
PEG (N=3), PEG _{m1}	monovalent	5900±600	0.5
PEG (N≈45), PEG _{m2}	monovalent	n.b.	-
PEG (N=27), PEG29	29	2160±70	1.4
PEG (N≈67), PEG50	50	4300±1400	0.7
PEG (N≈144), PEG79	79	4600±1900	0.7

Interessanterweise zeigt die räumliche Rasterung des löslichen Hämagglutinins noch ein zweites lokales Maximum der Affinität für den Komplex **NA26**, bei dem die beiden Liganden 26 Å voneinander entfernt präsentiert wurden. Die Arbeiten von *Sauter et al.*^[98], worin die kristallographische Existenz einer schwachen seitlichen Bindungsstelle im Abstand von 22 Å durch den Raum diskutiert wird, lassen die Vermutung zu, dass dieser Effekt auf die verbrückende Bindung einer stärkeren kanonischen und einer schwächeren seitlichen Bindungsstelle zurückgeführt werden kann.

Auch hierfür wurde eine Analyse möglicher Wege durchgeführt (Abbildung 17C). Im ersten Fall (grün) wird eine kanonische Bindungsstelle eines HA-Monomers mit einer sekundären Bindungsstelle eines benachbarten HA-Monomers überbrückt, was einer Distanz von 70 Å entspricht. Im zweiten Fall wird eine kanonische und eine sekundäre Bindungsstelle eines HA-Monomers überbrückt, was mit einer Distanz von 23 Å abgeschätzt werden konnte. Der kürzere zweite Weg liegt damit in guter Übereinstimmung mit dem beobachteten lokalen Affinitätsmaximum bei 26 Å.

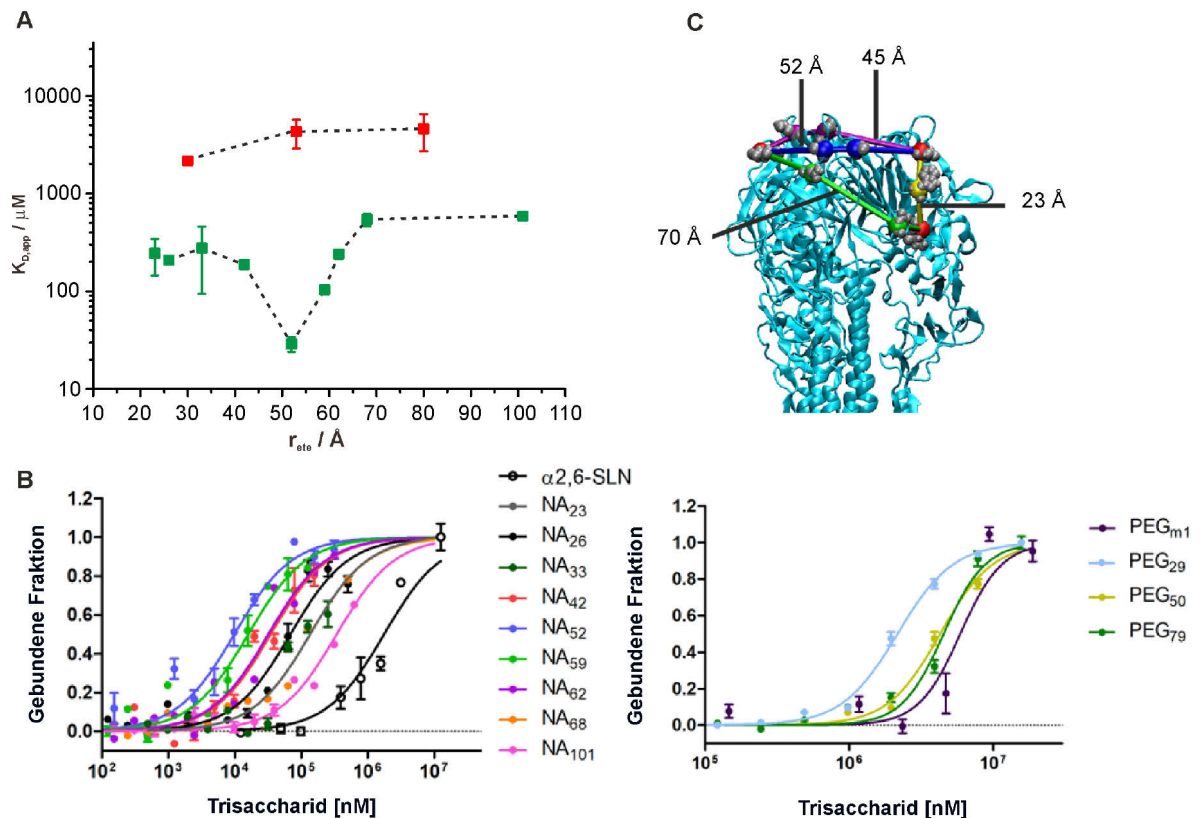


Abbildung 17: (A) Distanz-Affinitäts-Beziehung für die Bindung bivalenter PNA·DNA-Komplexe (grün) oder bivalenter PEG-Konjugate (rot) mit löslichem Hämagglutinin. (B) Darstellung der Bindungssättigung in Abhängigkeit der Ligandkonzentration für Glyko-PNA·DNA-Komplexe (links) und Glyko-PEG-Konjugate (rechts). Die Affinitätsmessungen mittels mikroskaliger Thermophorese wurden von Dr. Daniel Lauster (AG Herrmann, HU Berlin) durchgeführt. (C) Analyse potentieller Wege entlang der Oberfläche des viralen Hämagglutinins (cyan, 1HGG.pdb) um zwei Liganden miteinander zu verbrücken, die entweder an zwei kanonische Bindungsstellen (blau, lila) oder einer sekundären und einer kanonischen Bindungsstelle (grün, gelb) gebunden sind. C α -Atome der Aminosäuren in sphärischer Darstellung: Aminosäure 633 und 630 in blau, 691 und 698 in lila, 635 und 673 in grün und 221 in gelb. Die C1-Atome der Glucose-Einheiten wurden in roter sphärischer Darstellung gezeigt. Zur Vereinfachung wurden nur zwei Kohlenhydrate der kanonischen Bindungsstellen und ein Kohlenhydrat der sekundären Bindungsstelle gezeigt. Diese Abbildungen wurden mit Erlaubnis der *American Chemical Society* verwendet.^[104]

Zusammengefasst haben die Bindungsstudien der definierten bivalenten PNA·DNA-Gerüste mit dem löslichen Hämagglutinin eine ausgeprägte bimodale Distanz-Affinitätsbeziehung ergeben.

Dabei konnten Informationen über die optimale Anordnung eines bivalenten Binders für eine affine Interaktion mit dem Hämagglutinin gewonnen und Hinweise über die Existenz einer schwachen sekundären Bindungsstelle erhalten werden.

Im Gegensatz zu den starren Gerüsten auf Nukleinsäurebasis, zeigten alle bivalenten PEG-Konjugate gegenüber dem bHA nur sehr schwache Bindungsaffinitäten im niedrigen millimolaren Bereich (Tabelle 1 und Abbildung 17A, rote Quadrate; Abbildung 17B rechts). Im Vergleich der drei getesteten Ligand-Ligand-Abstände ist nur eine geringe Distanz-Affinitäts-Abhängigkeit erkennbar. Hierbei zeigte das kürzeste Konjugat **PEG29**, in dem die beiden Glykoliganden in einem Abstand von 29 Å getrennt vorliegen, die höchste Affinität ($K_D = 2160 \pm 70 \mu\text{M}$), die jedoch in der Größenordnung des monovalenten Trisaccharids ($K_D = 3100 \pm 250 \mu\text{M}$) liegt. Es stellt sich die Frage, warum die bivalenten PEG- und PNA·DNA-Konstrukte so unterschiedliche Ergebnisse aufweisen, obwohl sie in **NA52** und **PEG50** die Glykoliganden fast im gleichen Abstand präsentieren. Ein Vergleich der Affinitäten der monovalenten Binder **PEGm1** und **NAm** mit dem freien Sialyl-LacNAc **17** unterstreicht die beobachteten gerüstspezifischen Unterschiede. Beim monovalenten PNA·DNA-Gerüst wird die Affinität gegenüber dem bHA (3.6-fach) leicht gesteigert, was mit hydrophoben Interaktionen oder eventuell mit einem Phosphodiester-vermittelten Anstieg der Konzentration der Calcium-Ionen in der Umgebung der Calcium-abhängigen Glykobindungsstelle begründet werden könnte. Auf der anderen Seite scheint das PEG-Gerüst die Wechselwirkung zwischen dem Glykoliganden und dem bHA zu behindern, da die Affinität des monovalenten PEG-Konjugats gegenüber dem freien Trisaccharid **17** sinkt (1.9-fach). Diese Untersuchung verdeutlicht, dass beide Gerüsttypen sich bereits auf monovalenter Ebene grundlegend voneinander unterscheiden.

4.2.2 Analyse der bivalenten Wechselwirkungen mit löslichen Hämagglutinin-Trimeren mit Modellen der statistischen Mechanik

Um die Bedeutung der Gerüstringe und -flexibilität genauer zu verstehen, wurde die bivalente Bindung von Susanne Liese (AG Netz, FU Berlin) mittels Polymermodellen der statistischen Mechanik genauer untersucht. Für detaillierte Beschreibungen und ausführliche Herleitungen der verwendeten Formeln wird auf *Liese et al.*^[104] verwiesen. Für eine quantitative Analyse müssen alle relevanten Bindungsmodi zwischen einem bivalenten Konstrukt und dem Hämagglutinin-Trimer, mit drei kanonischen Bindungsstellen auf der Oberseite sowie drei potentiellen sekundären Bindungsstellen an den Seiten des bHA, berücksichtigt werden (Abbildung 18A). Die Dissoziationskonstante $K_{D,mv}$ für ein monovalent gebundenes Konjugat ist gegeben durch

$$K_{D,mv} = \frac{K_{mono}}{\exp\left[\frac{\Delta G_{spacer}}{k_B T}\right] \alpha} \quad (1),$$

in der K_{mono} die Dissoziationskonstante des monovalenten Liganden in unkonjugierter Form und ΔG_{spacer} die Wechselwirkung zwischen dem Gerüst und Rezeptor beschreibt. Bei α handelt es sich um einen gerüstabhängigen Parameter, der wiederum die sterische Repulsion zwischen Gerüst und Rezeptor beschreibt. Aus den Messungen des konjugierten (**NAm**) und des unkonjugierten (**SLN**) Trisaccharids **17** konnte ein $\Delta G_{spacer} = 1.98 k_B T$ für Konjugate des PNA·DNA-Gerüst extrahiert werden. Für die PEG-Konjugate dagegen, konnte der Wert des monovalenten Konjugats **PEGm1** sehr gut ohne zusätzliche Wechselwirkung mit $\Delta G_{spacer} = 0$ reproduziert werden. Eine Untersuchung der Röntgenkristallstruktur zeigte eine einheitliche Verteilung von Ladungen und Hydrophobizität auf der Proteinoberfläche (Abbildung 18B). In Übereinstimmung mit der Analyse der Dissoziationskonstanten der konjugierten und unkonjugierten monovalenten Binder wird daher eher von einer schwachen Wechselwirkung zwischen Gerüst und Proteinoberfläche ausgegangen.

Die Dissoziationskonstante $K_{D,bv,can}$ für die bivalente Anbindung an zwei kanonische Bindungsstellen ist beschrieben durch

$$K_{D,bv,can} = \frac{K_{mono}^2}{\exp\left[\frac{\Delta G_{spacer}}{k_B T}\right] 2\pi c_{eff}(d_{can})} \quad (2),$$

wobei die effektive Konzentration $c_{eff}(d_{can})$ ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Verbrückung von zwei kanonischen Bindungsstellen darstellt und d_{can} den Abstand zwischen zwei kanonischen Bindungsstellen angibt. Der dritte zu beachtende Bindungsmodus ist die Verbrückung einer kanonischen mit einer sekundären Bindungstasche. Für diesen Fall wurde in Analogie zu Gleichung 2 die Dissoziationskonstante K_{sec} für die sekundäre Bindungsstelle eingeführt, sodass sich daraus ergibt:

$$K_{D,bv,sec} = \frac{K_{mono} K_{sec}}{\exp\left[\frac{\Delta G_{spacer}}{k_B T}\right] 2\pi c_{eff}(d_{sec})} \quad (3),$$

worin d_{sec} für den Abstand zwischen einer kanonischen und einer sekundären Bindungsstelle steht. Für eine quantitative Beschreibung der bivalenten Bindung ist die effektive Konzentration von zentraler Bedeutung.^[32] Die effektive Konzentration c_{eff}^{flex} der flexiblen PEG-Konjugate wurde als frei bewegliche Gaußkette mit einem End-zu-End-Abstand von r_{ete} (Gleichung 4) bestimmt, wobei d die Distanz zwischen den Bindungsstellen beschreibt. Die effektive Konzentration c_{eff}^{rigid}

der rigiden PNA·DNA-Komplexe wurde als harmonische Feder mit einem mittleren Abstand r_{ete} beschrieben (Gleichung 5), die um Δr um den mittleren Abstand fluktuiert.

$$c_{eff}^{flex}(d) = \frac{8\sqrt{6}a^2}{\pi^{7/2}r_{ete}^5} \exp\left[-\frac{3}{2}\left(\frac{d}{r_{ete}}\right)^2\right] \quad (4)$$

$$c_{eff}^{rigid}(d) = \frac{1}{2(2\pi)^{3/2}} \frac{\exp\left[-\frac{1}{2}\frac{(d-r_{ete})^2}{\Delta r^2}\right]}{\Delta r r_{ete}^2} \quad (5)$$

Aus den Gleichungen 1, 2, und 3 kann die Dissoziationskonstante für jeden Bindungsmodus berechnet werden. Die Konzentration der belegten Bindungstaschen lässt sich nun durch Kombination aller Möglichkeiten, in denen ein bis drei Liganden an HA binden können, aufsummieren. Dabei wurde für die MST-Messungen angenommen, dass der apparente K_D erreicht wurde, wenn die Hälfte der kanonischen Bindungsstellen belegt sind und sich die Stärke des beobachteten Effekts proportional zur Konzentration der belegten Rezeptoren des Analyten verhält.^[104] Die fehlenden Parameter d_{can} , d_{sec} , Δr und K_{sec} wurden mittels Fit (grüne Linie, Abbildung 18C) an die experimentellen Daten (grüne Quadrate, Abbildung 18C) erhalten. Die grauschattierten Bereiche geben dabei die Unsicherheit aufgrund des Fehlers von K_{mono} wieder. Das globale Minimum der grünen Kurve wird der bivalenten Bindung an zwei kanonische Bindungsstellen mit $d_{can} = 52 \pm 1 \text{ \AA}$ und $\Delta r = 4.1 \pm 0.2 \text{ \AA}$ zugeordnet. Dies erfolgt in Übereinstimmung mit der auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur ermittelten $45\text{-}52 \text{ \AA}$, die notwendig sind, um die anomeren Kohlenstoffatome zweier Glykoliganden in zwei kanonischen Bindungsstellen über die Proteinoberfläche zu verbinden (Abbildung 17C). Im Kontext der früher beschriebenen zusätzlichen sekundären Bindungsstelle^[98] kann das lokale Minimum bei 26 \AA der bivalenten Verbrückung einer kanonischen und einer sekundären Bindungsstelle zugeordnet werden. Auf Grundlage des Fits wurden $d_{sec1} = 28 \pm 3 \text{ \AA}$ für die Verbrückung von Bindungsstellen innerhalb eines HA-Monomers und $d_{sec2} = 63 \pm 20 \text{ \AA}$ für Bindungsstellen benachbarter HA-Monomere ermittelt. In diesem Zusammenhang wurde ein $K_{D,sec}$ bestimmt, der zwei Größenordnungen größer als die Dissoziationskonstanten der kanonischen Bindungsstellen ist ($K_{sec} = 200 \pm 90 \text{ mM}$ und $K_{mono} = 3 \text{ mM}$) und aus diesem Grund bei Affinitätsmessungen mit monovalenten Bindern bislang unentdeckt geblieben ist. Zusammenfassend könnte die Kombination von DNA-basierter räumlicher Rasterung mit Berechnungen auf Grundlage statistischer Mechanik eine generische Methode zur Verfügung stellen, um Dissoziationskonstanten von Bindungsstellen mit schwacher Affinität abzuschätzen.

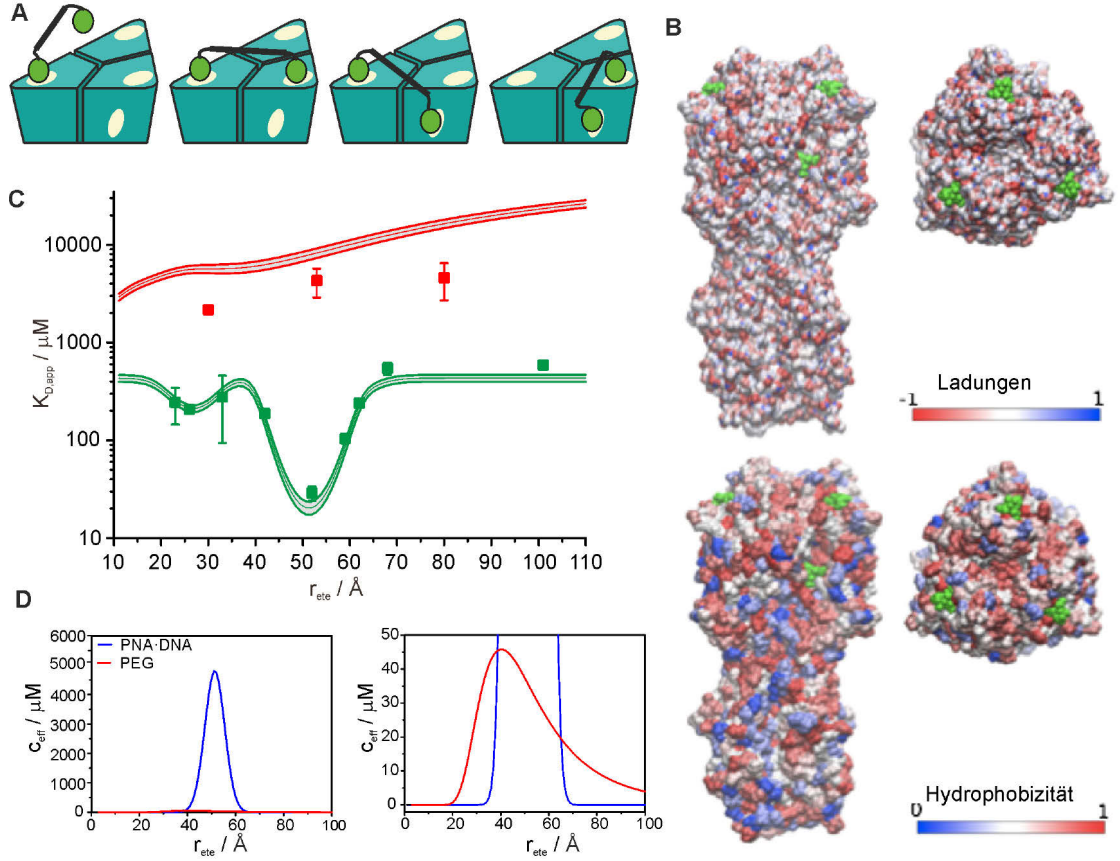


Abbildung 18: Untersuchung der Wechselwirkungen bivalenter PNA·DNA-Komplexe und PEG-Konjugate mit Hämagglutinin mithilfe von Modellen der statistischen Mechanik. (A) Verschiedene Bindungsmodi eines bivalenten Komplexes an das HA-Trimer. Von links: monovalente Anbindung an eine kanonische Bindungsstelle; bivalente Bindung an zwei kanonische Bindungsstellen; bivalente Bindung an einer kanonischen und einer sekundären Bindungsstelle zweier benachbarter HA-Monomere; bivalente Bindung an einer kanonischen und einer sekundären Bindungsstelle eines HA-Monomers; gezeigt wurde nicht die gleichzeitige bivalente Anbindung an einer kanonischen und einer sekundären Bindungsstelle mit einer zusätzlichen monovalenten Anbindung an einer kanonischen Bindungsstelle. (B) Verteilung von Ladungen und Hydrophobizität auf der Oberfläche des Hämagglutinins. Die Ladungen wurden entsprechend des Charmm27-Kraftfelds^[134] zugeordnet. Die Hydrophobizität folgt der Skala nach Black und Mould.^[135] (C) Fit (grüne Linie) an die experimentell ermittelten Affinitäten der bivalenten PNA·DNA-Gerüste (grüne Quadrate) und Modellierung der Affinitäten der bivalenten PEG-Konjugate (rote Linie); experimentell bestimmte Affinitäten der bivalenten PEG-Konjugate (rote Quadrate); die grauschattierten Bereiche geben die Ungenauigkeiten an, die auf dem Fehler von K_{mono} beruhen; (D) Effektive Konzentration der Liganden auf PNA·DNA- (blau) und PEG-Gerüsten (rot) für die Parameter $d = d_{\text{can}} = 52.1 \text{ \AA}$ und $\Delta r = 4.1 \text{ \AA}$; in beiden Graphen sind die gleichen Daten mit unterschiedlicher Skalierung gezeigt; Die Berechnungen wurden von Susanne Liese (AG Netz, FU Berlin) durchgeführt.

Mit $K_{\text{mono}} = 3100 \pm 250 \mu\text{M}$ und den mittleren End-zu-End-Abständen aus dem elastischen Polymermodell kann der apparente K_D der bivalenten PEG-Konjugate parameterfrei auf Basis der effektiven Konzentration modelliert werden. Der Verlauf der modellierten Kurve (rote Linie, Abbildung 18C) zeigt, dass mit PEG-Gerüsten unter Verwendung dieser Liganden am HA keine bivalente

Verstärkung erreicht werden kann. Eine Erklärung hierfür liefert ein Vergleich der effektiven Konzentrationen der unterschiedlichen Gerüste (Abbildung 18D, übernommen von Susanne Liese und mit Erlaubnis der *American Chemical Society* verwendet^[104]). Die Darstellung der effektiven Konzentration der PNA·DNA- und PEG-Gerüste für $d = d_{\text{can}} = 52.1 \text{ \AA}$ und $\Delta r = 4.1 \text{ \AA}$ verdeutlicht, dass die effektive Konzentration, die durch das PNA·DNA-Gerüst vermittelt wird, Werte im millimolaren Bereich annimmt, wohingegen die der PEG-Gerüste auf den mikromolaren Bereich beschränkt bleibt. Dieses Ergebnis führt zu einer wichtigen Schlussfolgerung: ein PEG-Gerüst wird nur eine bivalente Verstärkung zeigen, wenn die Affinitäten der Liganden mindestens im unteren mikromolaren Bereich liegen, was auf Sialyl-LacNAc-Liganden nicht zutrifft.

In ihren Arbeiten verwendeten *Knowles et al.*^[88] zur Verknüpfung von zwei Sialinsäuren PEG-artige Gerüste mit einer Länge von 37-49 Atomen. Nach dem Modell der elastischen Polymere ergibt sich für deren Konstrukte ein mittlerer Abstand von 11-13 \AA . Auch für diese Verbindungen konnte gegen bHA kein Bivalenzeffekt berichtet werden. Während dieses Resultat mit der wesentlich größeren euklidischen Distanz von 42 \AA zwischen zwei kanonischen Bindungsstellen und 26 \AA zwischen einer kanonischen und einer sekundären Bindungsstelle desselben HA-Monomers (nach 1HGG.pdb) erklärt werden kann, deuten die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden, auf eine generelle Limitierung von PEG-Gerüsten für die Verbrückung von weiter entfernten schwachen Bindungsstellen hin.

4.2.3 Räumliche Rasterung von Hämagglutinin auf viralen Influenza-Partikeln in der mikroskaligen Thermophorese

In den beiden vorherigen Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 wurde die DNA-programmierte räumliche Rasterung von löslichem Hämagglutinin und dessen Analyse durch Verknüpfung der experimentellen Ergebnisse mit Polymermodellen der statistischen Mechanik vorgestellt. Im Folgenden soll diese Methode auf eine weniger definierte Umgebung von Hämagglutininen auf einer viralen Oberfläche angewendet werden. Der mittlere Abstand der Mittelpunkte einzelner HA-Trimere wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Kai Ludwig (AG Böttcher, FU Berlin) mit $101.7 \pm 0.6 \text{ \AA}$ bestimmt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen können die einzelnen Bindungsstellen nicht aufgelöst werden. Aufgrund der Unsicherheit der Orientierung der HA-Trimere entlang ihrer vertikalen Achse kann für die Abstände der Bindungsstellen zweier benachbarter Trimere ein Bereich von 49 - 154 \AA ermittelt werden. Daraus resultiert für den dichtesten Abstand zwischen zwei benachbarten Bindungsstellen zweier angrenzender HA-Trimere ein Bereich von 49 - 66 \AA (Abbildung 19A).

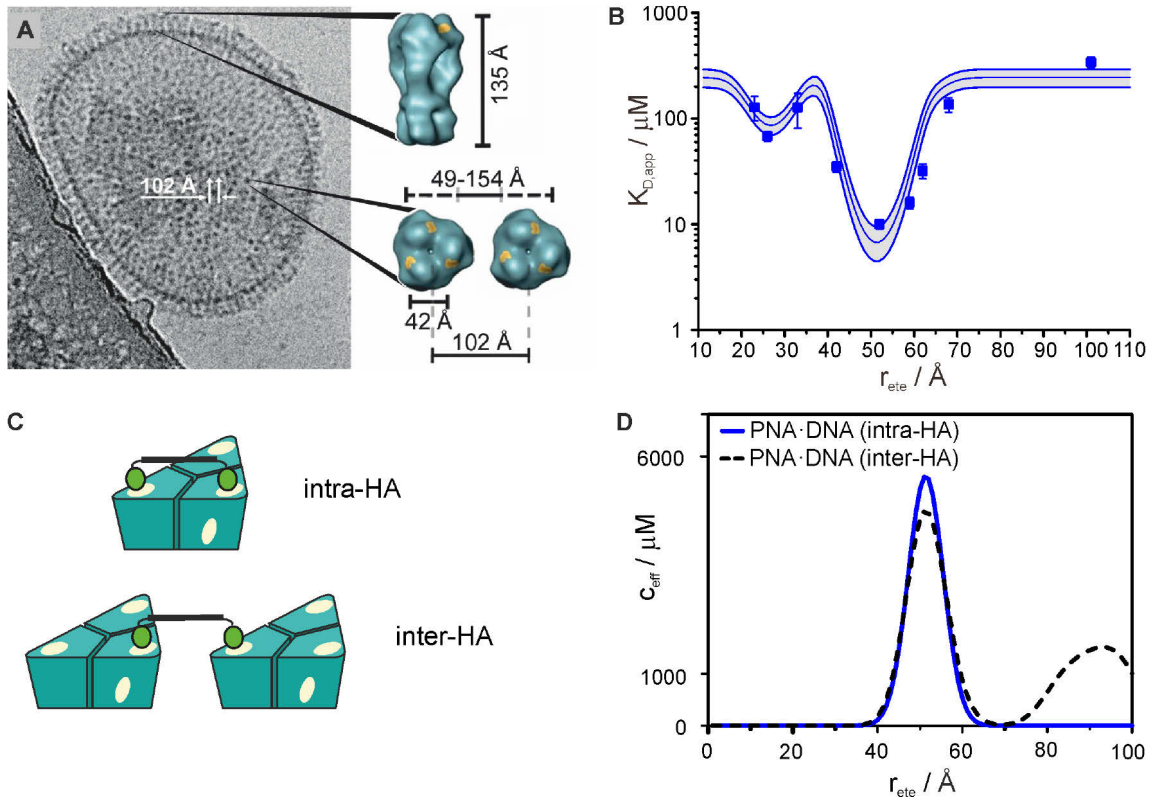














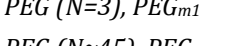
Abbildung 19: DNA-programmierte räumliche Rasterung von Hämagglutininen auf viralen Partikeln und Analyse des Bindungsmodus mit Modellen der statistischen Mechanik. (A) Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahme des humanen Influenza A-Virus (X-31) mit den trimeren Hämagglutininen auf der viralen Oberfläche. Die mittlere Distanz zwischen den Mittelpunkten zweier benachbarter HA-Trimere wurde mit $101.7 \pm 0.6 \text{ Å}$ bestimmt.^[104] Die Oberflächendarstellung der HA-Trimere zeigt die kanonischen Kohlenhydratbindungsstellen in gelb. Die Distanz von 42 Å zwischen zwei benachbarten Bindungstaschen eines HA beziehen sich auf die euklidische Distanz und berücksichtigt nicht die Undurchdringlichkeit der Proteinoberfläche. Die Distanzspanne von $49-154 \text{ Å}$ bezieht sich auf den Abstand zwischen zwei kanonischen Bindungsstellen von zwei benachbarten, frei rotierbaren HA. (B) Distanz-Affinitäts-Beziehung für die Anbindung bivalenter Konjugate. Ausgefüllte Quadrate repräsentieren die K_D -Werte für die Wechselwirkung bivalenter PNA·DNA-Komplexe, die in der mikroskaligen Thermophorese ermittelt wurden (Tabelle 2). Die durchgezogene blaue Linie zeigt die Ergebnisse der Berechnungen basierend auf der Annahme intratrimerischer Bindung. Die grauschattierten Bereiche entsprechen den Unsicherheiten der experimentell ermittelten monovalenten Dissoziationskonstante. (C) Schematische Darstellung zweier potentieller Bindungsmodi eines bivalenten Komplexes mit HA-Trimern auf der viralen Oberfläche: intramolekulare (oben) und intermolekulare HA-Bindung (unten). Alle Abbildungen wurden mit Erlaubnis der *American Chemical Society* verwendet.^[104] (D) Distanzabhängigkeit der effektiven Konzentration intramolekularer (blaue Linie) und intermolekularer (schwarz gestrichelte Linie) Bindung von bivalenten PNA·DNA-Konjugaten an HA-Trimere für die Parameter $d = d_{\text{can}} = 52.1 \text{ Å}$ und $\Delta r = 4.1 \text{ Å}$. Die Berechnungen wurden von Susanne Liese (AG Netz, FU Berlin) durchgeführt.

Die Affinitäten der PNA·DNA-Gerüste für R18 markierte A/X31 (H3N2)-Viren wurden mittels mikroskaliger Thermophorese untersucht. Bei R18 handelt es sich um den lipophilen Membran-

marker Octadecyl-rhodamin-B-chlorid. Die DNA-programmierte bivalente Rasterung zeigte erneut eine bimodale Distanz-Affinitäts-Beziehung (Tabelle 2 und Abbildung 19B, blaue Quadrate). Dabei wurden Affinitätsoptima bei Abständen von 8 und 16 Nukleotiden zwischen den Trisacchariden erhalten, was 26 und 52 Å entspricht. Im Vergleich mit der Affinitätskurve die für das bHA (Abbildung 18 C, grün) erhalten wurde, erscheint das zweite Optimum bei 52 Å breiter und hohe Affinitäten ($<35 \mu\text{M}$) wurden bis zu einem Abstand von 62 Å erhalten. Das erste Optimum bei 26 Å könnte auf eine Verbrückung einer kanonischen und einer sekundären Bindungsstelle zurückzuführen sein, wobei das zweite Optimum wahrscheinlich die intramolekulare Erkennung zweier kanonischer Bindungsstellen wiedergibt. Die Verbreiterung der Affinitätskurve könnte allerdings für zusätzliche Beiträge aus intermolekularen Bindungsmodi sprechen (HA-HA-Verbrückung, Abbildung 19C). Auffallend ist, dass die bivalenten Komplexe **NA23** - **NA101** höhere Affinitäten für das Virus als gegen das bHA aufweisen. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für das monovalente Sialyl-LacNAc-Derivat **17** ($K_D(\text{SLN}, \text{X31}) = 1760 \pm 40 \mu\text{M}$ und $K_D(\text{SLN}, \text{bHA}) = 3100 \pm 250 \mu\text{M}$) beobachtet. Neben Hämagglutininen befinden sich auch Neuraminidase (NA)-Proteine auf der viralen Oberfläche, welche ebenfalls an Sialinsäure binden. Aufgrund der geringen NA-Dichte (40-50 NA im Vergleich zu 300-400 HA) und der Tatsache, dass in früheren Untersuchungen die Aktivitäten von HA-Bindern unbeeinflusst vom Einsatz von Neuraminidase-Inhibitoren blieben, sollte dieses Enzym wenn überhaupt nur einen geringen Einfluss auf die Bindung des Trisaccharids an den Virus ausüben.^[88, 136] Die erhöhte Affinität gegen das Virus kann auch im Zusammenhang mit den zusätzlichen Bindungsmöglichkeiten in unmittelbarer Umgebung eines HA-Trimers stehen. Aufgrund der hohen Dichte an HA auf der viralen Oberfläche, ist eine Verbrückung zweier benachbarter Trimere vorstellbar (Abbildung 19C). Um die Möglichkeit dieses zusätzlichen Bindungsmechanismus genauer zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit Susanne Liese (AG Netz, FU Berlin) die effektive Konzentration für den Fall einer intermolekularen Bindung bestimmt (Abbildung 19D, schwarz gestrichelt) und der zuvor diskutierten effektiven Konzentration für intramolekulare Bindung gegenübergestellt (Abbildung 19D, blaue Linie). Auch beim intermolekularen Fall ist ein Maximum bei 50 Å zu erkennen, was zu einer Verbreiterung der Affinitätskurve (vgl. Abbildung 18C) beitragen könnte. Daneben wird ein zweites breites Maximum um 90 Å ersichtlich. Diese Analyse verdeutlicht, dass der Komplex **NA101**, der die Trisaccharide in einem Abstand von $r_{\text{ete}} = 101 \text{ Å}$ präsentiert, einen $c_{\text{eff}}^{\text{rigid}}$ besitzen sollte, der über der Dissoziationskonstante der monovalenten Wechselwirkung liegen sollte, was wiederum zu einem niedrigen K_D führen sollte. Jedoch wurde für diesen Komplex der höchste K_D in der Serie der bivalenten PNA-DNA-Konjugate gemessen (Tabelle 2, Abbildung 19B). Die hohe effektive Konzentration bei 90 Å könnte durch andere Effekte abgeschwächt worden sein. Beispielsweise würde die Diffusion einzelner HA-Trimere entlang der viralen Membran die verbrückende Bindung zweier Trimere beeinträchtigen.^[137] Über

den Rahmen dieser Arbeit hinaus wäre eine Abschätzung der Bindungsaffinitäten einer intermolekularen Bindung möglich, wenn die entropische Bestrafung, die eine Verhinderung der lateralen Diffusion mit sich bringen würde, quantifiziert werden könnte. Hierzu wäre zunächst ein tiefergehendes Verständnis des konformationellen Raumes zwischen zwei verbrückten HA-Trimeren notwendig.

Tabelle 2: Bindungsaffinitäten von Sialyl-LacNAc und Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen gegenüber A/X31 (H3N2)-Viren bestimmt mittels mikroskaliger Thermophorese. Die MST-Messungen wurden von Dr. Daniel Lauster (AG Herrmann, HU Berlin) durchgeführt.  modifizierte PNA-Oligomere,  unmodifiziertes PNA-Oligomer,  DNA-Templat,  α 2,6-Sialyl-LacNAc, n.b.= nicht bestimmbar.

Komplex	$r_{ete} / \text{\AA}$	$K_{D,app} / \mu\text{M (X31)}$
α 2,6-SLN 17	monovalent	1760 \pm 340
 , NA23	23	128 \pm 33
 , NA26	26	68 \pm 7
 , NA33	33	127 \pm 46
 , NA42	42	35 \pm 4
 , NA52	52	10 \pm 1
 , NA59	59	16 \pm 2
 , NA62	62	32 \pm 5
 , NA68	68	136 \pm 21
 , NA101	101	340 \pm 42
PEG (N=3), PEG _{m1}	monovalent	n.b.
PEG (N \approx 45), PEG _{m2}	monovalent	n.b.
PEG (N=27), PEG29	29	n.b.
PEG (N \approx 67), PEG50	50	n.b.
PEG (N \approx 144), PEG79	79	n.b.

Um den Einfluss der intra-HA-Bindung zu evaluieren, wurden dieselben Parameter (d_{can} , d_{sec} und Δr) wie bei der vorherigen Analyse der Bindung an das lösliche Hämagglutinin verwendet. Weiterhin wurden die Annahmen getroffen, dass $\Delta G_{spacer} = 1.98$ kBT und das Verhältnis zwischen den Dissoziationskonstanten der kanonischen und der sekundären Bindungsstelle K_{mono}/K_{sec} für bHA und den ganzen Virus gilt. Der einzige Unterschied liegt in dem verwendeten monovalenten K_D des unkonjugierten Trisaccharids. Das theoretische Modell, welches nur den Fall der intra-HA-Bindung berücksichtigt, beschreibt die experimentell erhaltenen Werte ausgesprochen gut (Abbildung 19B, blaue Linien). Daher wird angenommen, dass die intermolekulare HA-Bindung eine zu vernachlässigende Rolle spielt. Vielmehr wird vermutet, dass die höheren Affinitäten in unter-

schiedlichen Solvatationsenergien zwischen den kleinen HA-Trimeren in Lösung und den HA-Trimeren auf der viralen Oberfläche, welche die Gesamtbindungsenergie beeinflussen, begründet sind.








Es konnte demonstriert werden, dass Aussagen über multivalente Wechselwirkungsmechanismen durch die Ligandenpräsentation auf Hochpräzisionsgerüsten in Kombination mit theoretischen Modellen möglich sind.













4.2.4 Räumliche Rasterung von Hämagglutinin auf der viralen Oberfläche im Hämagglutinationstest

Um die mittels mikroskaliger Thermophorese erhaltenen Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 und 4.2.3 zu validieren, wurde nun auf den im Bereich der Virologie weitverbreiteten Hämagglutinationstest (HAI) zurückgegriffen. Zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten der Hämagglutination (K_i -HAI) eines Inhibitors wurde dieser in einer Verdünnungsreihe mit A/X31 (H3N2)-Viren inkubiert, woran sich die Zugabe einer Erythrozytenlösung und eine erneute Inkubation anschloss. Die geringste Konzentration des Inhibitors, die ausreichte, um eine virusbedingte Hämagglutination vollständig zu hemmen, entsprach dem K_i HAI-Wert. Das monovalente und unkonjugierte Trisaccharid **17** benötigte zur vollständigen Inhibition der Hämagglutination humaner Erythrozyten eine Konzentration von 50-60 mM (Tabelle 3). Das Inhibitionspotential der bivalenten Komplexe **NA23-NA101** zeigte sich dagegen um drei Größenordnung höher. Die effizienteste Inhibition wurde erreicht, wenn die beiden Zucker durch 7 (≈ 26 Å) oder 15-20 Nukleotide ($\approx 52 - 68$ Å) voneinander getrennt wurden. Dabei konnte mit Komplex **NA59** eine um eine Größenordnung bessere Inhibition als mit den Komplexen **NA85** und **NA101** erreicht werden, die die Zucker in deutlich größeren Abständen präsentierten. Interessanterweise wurde die optimale Inhibition bei 59 Å, und nicht wie in der mikroskaligen Thermophorese bei 52 Å, erhalten. Diese Abweichung wird auf die unterschiedlichen Bedingungen innerhalb dieser zwei Testmethoden zurückgeführt. Bei der mikroskaligen Thermophorese erfolgt die Bildung eines Komplexes zwischen den Viren und den Zuckerliganden, beim Hämagglutinationstest kommt es dagegen zur Ausbildung einer netzartigen Struktur, wenn die viralen Partikel von Erythrozyten agglutiniert werden. Dieser Prozess kann durch zusätzliche Effekte wie der sterischen Abschirmung beeinflusst werden. Trotz der Unterschiede in den durchgeführten Tests ist die Ähnlichkeit der Distanz-Affinitäts/Inhibitionsprofile bemerkenswert. Weiterhin wurde in beiden Untersuchungen das Fehlen einer deutlichen distanzabhängigen Wechselwirkung von PEG-verbrückten Sialyl-LacNAc-Liganden deutlich. Die PEG-Konjugate **PEG29** und **PEG50** waren im Hämagglutinationstest 10-fach potenter als der unkonjugierte monovalente Zucker **17**, was zwar als Indikator für Bivalenz angesehen werden kann, trotzdem inhibierten sie damit die Hämagglutination mit weniger als 1% des besten PNA-DNA-Konstrukts.

In einem Kontrollexperiment wurde der Einfluss der Veränderung des Abstands zwischen den Kohlenhydrat-Liganden bei gleichbleibender Nukleotidsequenz untersucht. Auf Grundlage von Komplex **NA59**, der die Liganden in einem Abstand von 59 Å anordnete, wurde für das PNA-Oligomer **PNA3**, bei dem der Ligand an Position 9 angebracht wurde, durch das sequenzanalogue PNA-Oligomer **PNA4** ersetzt, welches den Liganden an Position 4 trägt. Daraus resultierte im Komplex **NA42'** ein Abstand von 12 Nukleotiden (42 Å). Die ausbleibende Inhibition durch Komplex **NA42'**

im untersuchten Konzentrationsbereich (0.2-500 μM) bestätigte die Annahme, dass die Inhibition durch **NA59** auf einer geeigneten räumlichen Präsentation der Liganden und nicht auf der verwendeten Nukleotidsequenz beruht.

Tabelle 3: Inhibition der viralen Hämagglutination von Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen und Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugaten im HAI-Test. , , ,  modifizierte PNA-Oligomere,  unmodifiziertes PNA-Oligomer,  DNA-Templat,  $\alpha 2,6$ -Sialyl-LacNAc. ^a Die Werte geben die minimale Konzentration wieder, die notwendig ist, um eine Inhibition der Hämagglutination zu bewirken. Ein $K_{\text{HAI}} > x$ bedeutet, dass keine Inhibition der viralen Hämagglutination bis zu der angegebenen Konzentration x detektiert wurde.

Komplex	$r_{\text{ete}} / \text{\AA}$	$K_{\text{HAI}} / \mu\text{M} (X31)$
$\alpha 2,6$ -SLN 17	monovalent	60000
$\alpha 2,6$ -SL	monovalent	50000
 , NAm	monovalent	>2000
 , NA23	23	>500
 , NA26	26	83 \pm 21
 , NA33	33	>500
 , NA42	42	>500
 , NA42'	42	>500
 , NA52	52	63
 , NA59	59	44 \pm 6
 , NA62	62	63
 , NA68	68	78 \pm 18
 , NA85	85	>500
 , NA101	101	>500
PEG (N=3), PEG _{m1}	monovalent	-
PEG (N \approx 45), PEG _{m2}	monovalent	-
PEG (N=27), PEG29	29	5000
PEG (N \approx 67), PEG50	50	5000
PEG (N \approx 144), PEG79	79	>6000

Durch die Evolution des IAV ändert sich die Ektodomäne des Hämagglutinins, was die Rezeptorbindungsstellen einschliesst und damit einen Effekt auf die Wechselwirkung mit sialinsäuretragenden Liganden ausüben kann. Multivalente Glykoliganden könnten daher in der Lage sein, zwischen verschiedenen IAV-Stämmen zu differenzieren. In dieser Studie wurden virale Stämme der Serotypen H3N2, H1N1 und H7N1 getestet. Das Hämagglutinin vom aviären A/strain mute swan (H7N1) präferiert die Bindung von $\alpha 2,3$ -glykosidisch verknüpfter Sialinsäure. Wie erwartet zeigte der Komplex **NA59** keine inhibitorische Aktivität bis zur höchsten getesteten Konzentration (500 μM). In dieser Untersuchung fungierte unkonjugierte $\alpha 2,6$ -Sialyl-Lactose als positive Referenz für

die Inhibition der Hämagglutination der Stämme X31 (H3N2), Panama (H3N2) und Pr8 (H1N1). Mit einem $K_i^{HAI} = 50 \text{ mM}$ unterschied dieser monovalente Ligand nicht zwischen den verschiedenen viralen Stämmen. Für die Inhibition der beiden humanpathogenen Stämme X31 und Panama, die beide dem Serotyp H3N2 angehören, war das bivalente Konstrukt **NA59** ähnlich gut geeignet. Überraschenderweise wurde die Hämagglutination von Pr8 (H1N1) nicht von **NA59** im getesteten Konzentrationsbereich (0.2-500 μM) inhibiert. Dieser Unterschied im Inhibitionspotential, der mindestens einen Faktor 10 beträgt, steht für eine Spezifität, die in Anbetracht der nicht-selektiven Wechselwirkung des unkonjugierten $\alpha 2,6$ -Sialyl-Lactose-Liganden bemerkenswert ist. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Berichten von *Baker et al.*^[85], in denen von einer Verbesserung der Stammspezifität berichtet wurde, wenn 64 Sialinsäurereste über ein Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimer präsentiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass Spezifität gegenüber viralen Stämmen durch die geeignete Präsentation von nur zwei Zuckern erzeugt werden kann. Dabei könnten unterschiedliche Oberflächentopographien der Hämagglutinine verantwortlich für diese Ergebnisse sein.

Tabelle 4: NA59-induzierte Inhibition der Hämagglutination verschiedener Virusstämmen des antigenen Typ A.

Influenzastamm	Rezeptor-präferenz	$K_i^{HAI} / \mu\text{M}$ (NA59)	$K_i^{HAI} / \mu\text{M}$ (2,6 SL)
A/Aichi/1968/H3N2(X31)	$\alpha 2,6$	44	50000
A/Panama/1999/H3N2	$\alpha 2,6$	63	50000
A/Puerto Rico/8/1934/H1N1	$\alpha 2,6 / \alpha 2,3$	>500	50000
A/Mute swan/Germany/2006/H7N1LP	$\alpha 2,3$	>500	>50000

4.2.5 Einfluss erweiterter Gerüstflexibilität auf ausgewählte bivalente PNA·DNA-Komplexe

In den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.4 wurde die Eignung zweier völlig unterschiedlicher Gerüste für die bivalente Bindung an Hämagglutinin untersucht. Dabei offenbarten sich deutliche Vorteile der Präsentation von Glykoliganden auf rigiden Nukleinsäuregerüsten gegenüber flexiblen PEG-Gerüsten. Der Aspekt der räumlichen Vororganisation der beiden Liganden ist für eine effektive Anbindung an einen Rezeptor von besonderer Bedeutung. Wie der Analyse der Röntgenkristallstruktur (Abbildung 17C) zu entnehmen ist, liegen die Zucker-Bindungsstellen des Hämagglutinins nicht auf einer flachen Ebene. So ist es nachvollziehbar, dass der optimale Abstand der Glykoliganden entlang des PNA·DNA-Gerüsts etwas über der euklidischen Distanz von 42 Å liegt (52-59 Å). Die PNA-Sequenz entlang des PNA·DNA-Duplexes enthält Einzelstrangbrüche, was dem Gerüst gewisse Freiheitsgrade ermöglicht, um ungünstige Anordnungen der Liganden im Raum, zum Beispiel aufgrund der helikalen Torsion der Helix, zu kompensieren. Ob diese Flexibilität für eine optimale Anbindung an das Zielprotein ausreicht, ist schwer vorhersagbar. Daher wurden die bivalenten Komplexe NA59, NA68 und NA101 ausgewählt, um den Einfluss zusätzlicher Freiheitsgrade auf die Anbindung an den X31-Virus zu untersuchen. Bei Komplex **NA59_6mm** wurde die DNA-Templatsequenz derart gewählt, dass sechs fehlgepaarte Nukleotide zwischen den beiden Liganden vorliegen. Für **NA68_3bp** und **NA101_13bp** wurde das mittlere unmodifizierte PNA-Oligomer weggelassen, sodass ein Einzelstrangbereich von 13 Nukleotiden zwischen den beiden Liganden für deutlich mehr Gerüstflexibilität sorgen sollte. Die Integrität von Komplexen mit ungepaarten oder fehlgepaarten Nukleotiden zeigte sich in Denaturierungsexperimenten mit Schmelztemperaturen >60°C.

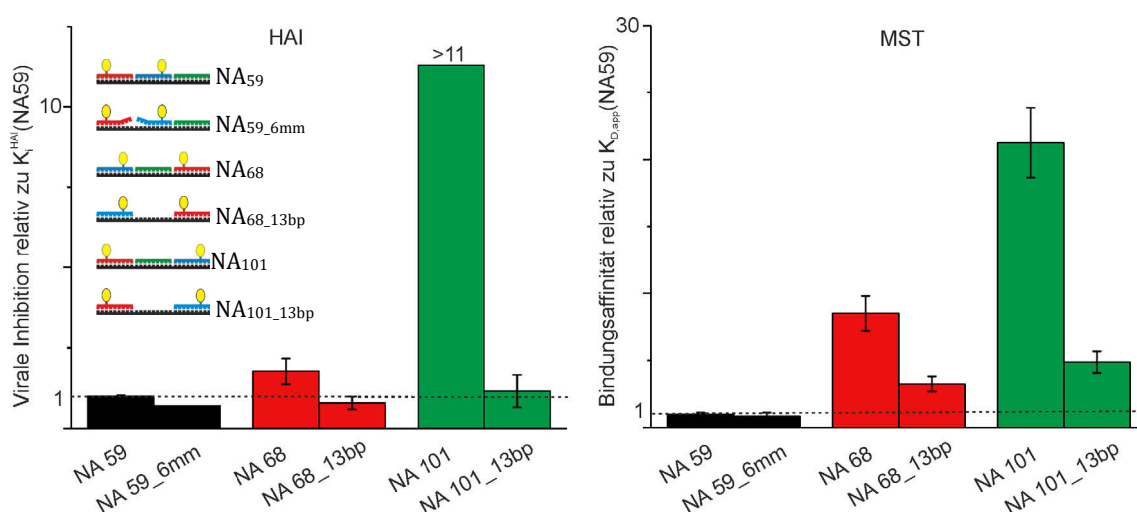


Abbildung 20: Vergleich bivalenter Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexe mit rigidem (NA59, NA68, NA101) und flexiblem (NA59_6mm, NA68_13bp, NA101_13bp) Nukleinsäurerückgrat im Hämagglutinationstest (links) und mikroskaliger Thermophorese (rechts).

In sehr guter Übereinstimmung der Ergebnisse aus Hämagglutinationstest und mikroskopischer Thermophorese zeigte sich, dass in diesem Fall nach Abstandsoptimierung nur noch geringfügige Verbesserungen durch zusätzliche Flexibilität erreicht werden konnten (Abbildung 20, schwarze Balken, Experimentelle Teil, Tabelle 17). Zum Vergleich wurden nun die Komplexe (**NA68**, **NA101**) herangezogen, die auf Grundlage der Distanz-Inhibitions/Affinitäts-Analyse die Zucker in zu großen Abständen (≈ 68 und ≈ 101 Å) für die Anbindung an ein Hämagglutinin-Trimer präsentieren (Kapitel 4.2.1 bis 4.2.4). Als eindeutig potenter stellten sich deren flexiblere Varianten **NA68_13bp** und **NA101_13 bp** heraus (Abbildung 20, rote und grüne Balken). Bemerkenswerterweise profitierten diese Komplexe durch Einführung der flexiblen Einzelstrangbereiche besonders stark. Es wurden Verbesserungen um bis zu einer Zehnerpotenz erreicht, was zu Inhibitions- und Bindungsaffinitäten in der Größenordnung des besten Komplexes **NA59** führte. In den Arbeiten von *Scheibe et al.*^[22] wurde eine DNA-programmierte räumliche Rasterung des *Erythrina cristagalli* Lektin mit bivalenten LacNAc-PNA-DNA-Komplexen durchgeführt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Einführung von Einzelstrangbereichen zu besseren Bindern führt, weil dadurch vermutlich eine bessere Anpassung an die konvexe Oberfläche des Zielproteins und damit eine günstigere Verbrückung der Bindungsstellen ermöglicht wird (Abbildung 6C).

4.3 Räumliche Rasterung von löslichen Hämagglutinin-Trimeren mit PeB-PNA-DNA-Komplexen in der mikroskaligen Thermophorese

In Kapitel 4.2.1 wurde die räumliche Rasterung der Bindungsstelle von löslichen Hämagglutinin-Trimeren mittels bivalenter Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe vorgestellt. Dabei wurde der native Ligand Sialyl-LacNAc verwendet und es konnte eine ausgeprägte Distanz-Affinitätsbeziehung festgestellt werden. In diesem Abschnitt wird die DNA-programmierte Abstandsrasterung auf einen peptidischen Liganden angewendet, dessen Bindungsstellen am Hämagglutinin weniger gut charakterisiert sind. *Memczak et al.*^[65] beschreiben die Ableitung von peptidischen Liganden aus Hämagglutinin-bindenden Antikörpern. Eines der vorgestellten antiviralen Peptide ist das 15 Aminosäuren umfassende **PeB**. Dieses wurde in Folgearbeiten als Ligand multivalent auf Nanopartikeln präsentiert und erwies sich als hochpotenter Inhibitor der viralen Infektion und Hämagglutination von A/X31-Viren.^[138] Es wird vermutet, dass **PeB** dabei in räumlicher Nähe zur kanonischen Bindungsstelle der Sialinsäure bindet (Abbildung 21A und B), weshalb eine bivalente Anbindung über ein PNA-DNA-Rückgrat als möglich erachtet wird.

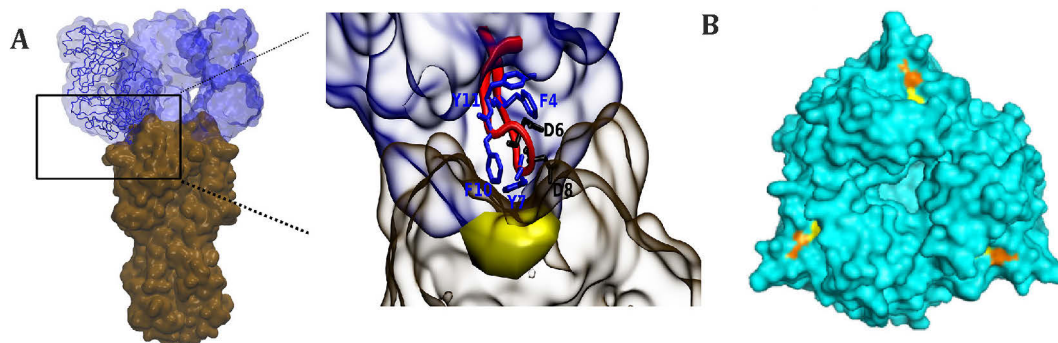


Abbildung 21: (A) Links: 3D-Struktur von drei Antikörperfragmenten (blau) die an jeweils eine HA1-Domäne des A/X31 Hämagglutinin (braun) gebunden sind (2vir.pdb). Rechts: die Vergrößerung der Interaktion von Antikörper und HA1 zeigt die räumliche Nähe der Interaktion von **PeB** und der Bindungsstelle für Sialinsäure (gelb). Für die Bindung förderliche Aminosäuren sind rot gekennzeichnet (Primärstruktur von **PeB**: ARDFYDYDVFFYYAMD). Beide Abbildungen stammen aus einer Publikation von *Memczak et al.*^[65] (B) Röntgenkristallstruktur (2vir.pdb) von Hämagglutinin aus A/X31. Der euklidische Abstand zwischen zwei benachbarten Bindungsstellen der Sialinsäure (gelb) beträgt etwa 42 Å und zwischen zwei potentiellen Bindungsstellen für **PeB** (orange) etwa 48 Å. Diese Abbildung stammt aus einer Arbeit von Dr. Daniel Lauster und wurde mit dessen Erlaubnis verwendet.^[139]

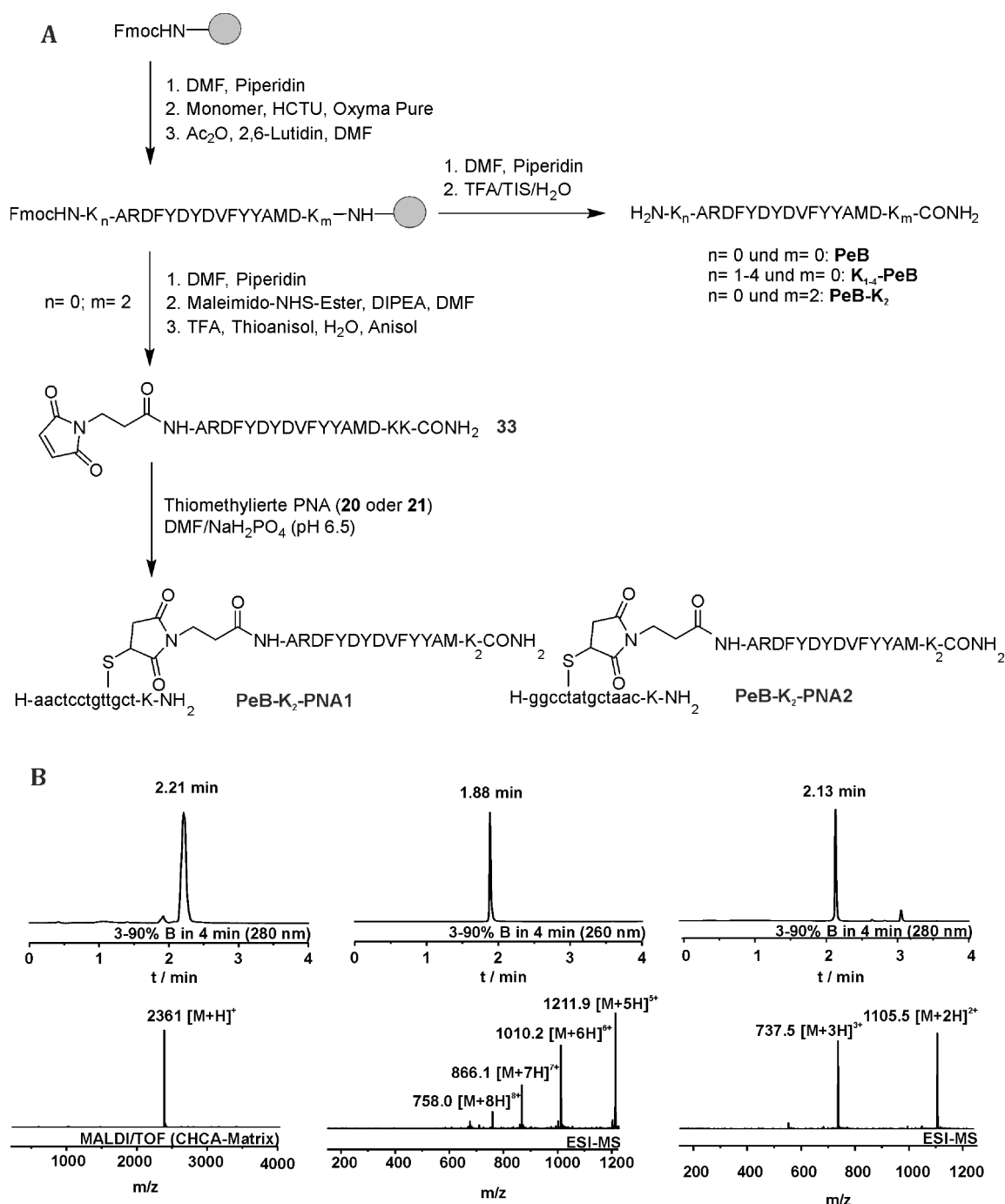


Abbildung 22: (A) Schema der Synthese von PeB-Peptiden, maleidomodifiziertem PeB-K₂ **33** und PeB-PNA-Konjugaten. (B) UPLC-UV-MS-Analyse von Maleimido-PeB-K₂ **33** (links), des PeB-PNA-Konjugats **PeB-K₂-PNA2** (Mitte) und **PeB-K₂** (rechts). PeB = ARDFYDYDVFFYYAM.

In dieser Arbeit wurde zunächst **PeB** mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt (Abbildung 22A). Aufgrund dessen geringer Löslichkeit im wässrigen Milieu wurden zusätzliche Varianten synthetisiert, bei denen N- oder C-terminal eingefügte Lysine die Hydrophilie der Peptide erhöhen sollten. Es zeigte sich, dass zwei Lysine ausreichten, um eine gute Löslichkeit im Wässrigen zu erreichen. Die Eignung dieser modifizierten Peptidsequenzen wurde im Hämagglutinationstest untersucht. Die Peptide bei denen N-terminale Lysine (**K₂₋₄-PeB**) eingefügt wurden, erreichten einen

$K_i^{\text{HAI}}(\text{K}_{2-4}\text{-PeB}) = 2.5 \text{ mM}$, wohingegen zwei C-terminale Lysine eine etwas höhere Inhibition von $K_i^{\text{HAI}}(\text{PeB-K}_2) = 1.3 \text{ mM}$ bewirkten. Verglichen mit dem nativen Liganden konnte eine deutliche Verbesserung der Inhibition erreicht ($K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN}) = 60 \text{ mM}$) werden. Andererseits ist die Inhibition 5-fach geringer als der in der Literatur beschriebene Wert für **PeB** ohne Lysin-Modifikationen ($K_i^{\text{HAI}}(\text{PeB}) = 235 \text{ }\mu\text{M}$).^[65]

Um verschiedene Ligand-Ligand-Abstände entlang des PNA-DNA-Duplexes zu realisieren, wurden in Analogie zu den bivalenten Trisaccharid-Komplexen mehrere PeB-PNA-Konjugate verschiedener PNA-Sequenzen hergestellt. Hierzu wurde das Peptid **PeB-K₂** zunächst an der festen Phase synthetisiert, ein Maleimid-Linker angebracht und vom festen Träger abgespalten (Abbildung 22A). Das Maleimido-Peptid **33** wurde anschließend mittels Thiol-Maleimid-Knüpfung an thioalkylierte PNA-Oligomere ligiert. Auf diese Weise konnten zwei PNA-Oligomere an den Positionen 4 und 9 mit dem PeB-Liganden modifiziert werden. Die zur Verfügung stehenden beiden PeB-PNA-Konjugate (**PeB-K₂-PNA1** und **PeB-K₂-PNA2**) sowie zwei weitere unmodifizierte PNA-13mere wurden mittels verschiedener DNA-Templatstränge derart arrangiert, dass ein monovalenter Komplex **PeBm** und drei bivalente Komplexe **PeB26**, **PeB59** und **PeB101** generiert werden konnten, die die zwei Liganden in Abständen von 26, 59 und 101 Å präsentierten. Am Komplex **PeB59** wurde exemplarisch gezeigt, dass mit einer Schmelztemperatur von >60 °C die Anbringung der Peptidliganden nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität des Duplexes ausübt.

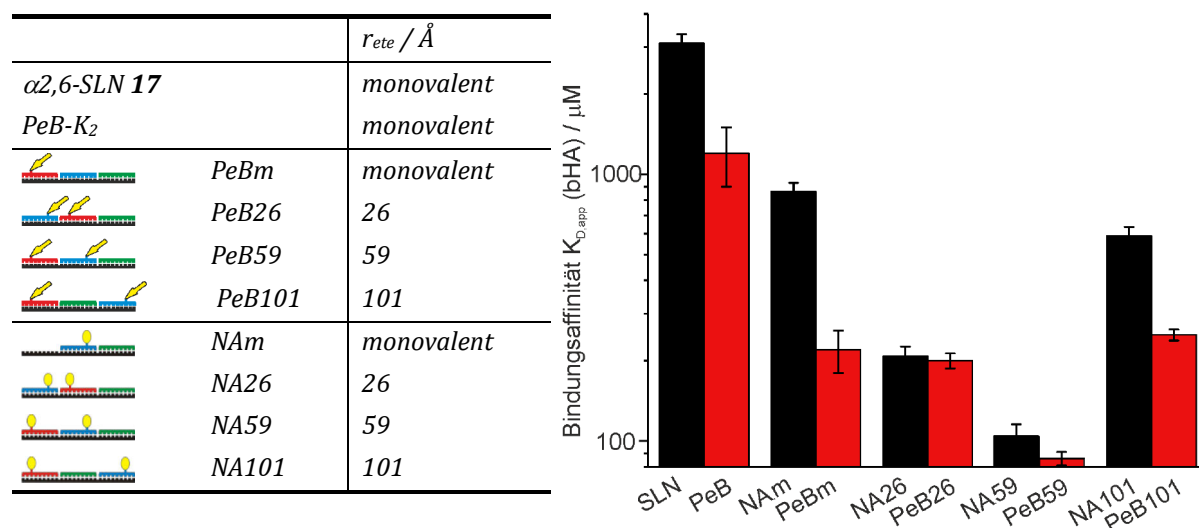


Abbildung 23: Vergleich der Bindungsaffinitäten von monovalenten und bivalenten PNA-DNA-Duplexen mit Sialyl-LacNAc- (schwarz) und PeB-Liganden (rot). Gezeigt sind die $K_{D,\text{app}}$ -Werte aus Messungen mit fluoreszenzmarkiertem bHA. Die MST-Messungen wurden von Daniel Lauster (AG Herrmann, HU Berlin) durchgeführt.

Die Affinitäten der PeB-PNA-DNA-Komplexe gegenüber löslichen Hämagglutinin-Trimeren (bHA) wurden mittels mikroskaliger Thermophorese untersucht. Hierbei zeigte der monovalente Komplex **PeBm** eine gesteigerte Affinität (5-fach) gegenüber dem freien PeB-K₂-Liganden ($K_i^{\text{HAI}}(\text{PeBm}) = 220 \mu\text{M}$ und $K_i^{\text{HAI}}(\text{PeB-K}_2) = 1200 \mu\text{M}$). Ein ähnliches Verhalten wurde bereits beim monovalenten Trisaccharid-Komplex **NAm** beobachtet (Kapitel 4.2.1) und als Ursache mögliche hydrophobe Interaktionen des PNA-DNA-Duplexes mit der viralen Oberfläche oder ein Phosphodiester-vermittelter Anstieg der Konzentration der Calcium-Ionen in der Umgebung der Calcium-abhängigen Glykobindungsstelle, angenommen. In der Reihe der untersuchten bivalenten PeB-Komplexe offenbarte sich erneut eine Distanz-Affinitätsabhängigkeit, wobei Komplex **PeB59** zwar nur eine geringe, aber in der Serie der drei untersuchten bivalenten Komplexe die höchste Affinitätsverstärkung (2,5-fach) gegenüber dem monovalenten Komplex **PeBm** zeigte ($K_i^{\text{HAI}}(\text{PeB59}) = 86 \mu\text{M}$, Abbildung 23, rote Balken). Für Komplex **PeB26**, der die beiden PeB-Liganden im kleineren Abstand (26 Å) präsentierte, zeigte sich nur eine minimale Verbesserung zum monovalenten K_D ($K_D(\text{PeB26}) = 200 \pm 13 \mu\text{M}$) und für **PeB101** sogar eine verschlechterte Bindungsaffinität ($K_D(\text{PeB101}) = 250 \pm 12 \mu\text{M}$). Diese Ergebnisse lassen eine bivalente Anbindung für **PeB26** und **PeB101** als eher unwahrscheinlich und für den bivalenten Komplex **PeB59**, mit einem Abstand von 59 Å zwischen den Peptidliganden, als möglich erscheinen. Dieser Abstand steht im guten Einklang mit dem auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur des Hämagglutinins bestimmten euklidischen Abstand zweier potentieller PeB-Bindungsstellen von 48 Å (Abbildung 21B). Auch unter den bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen **NA26**, **NA59** und **NA101** erwies sich der mittlere Abstand (59 Å) als optimal. Da die Bindungsstellen von PeB und Sialinsäure in unmittelbarer Nähe voneinander vermutet werden, kann die Ähnlichkeit der beiden Distanz-Affinitätsbeziehungen als Indiz für die Richtigkeit dieser Annahme aufgefasst werden. Die geringe multivalente Verstärkung zum jeweils monovalenten Komplex von **PeB59** (2,5-fach) in Relation zu **NA59** (8,2-fach) zeigt das Optimierungspotential bei der bivalenten Präsentation der PeB-Liganden auf. Da mit drei unterschiedlichen Distanzen nur eine grobe Untersuchung der Abstandsabhängigkeit vorgenommen wurde, könnten zusätzliche Distanzen, vermutlich im Bereich um 59 Å, zu noch affineren bivalenten PeB-Komplexen führen. Des Weiteren könnte die Abhängigkeit der Affinität von der N- und C-terminalen Anbringung der Peptide an die PNA-Oligomere untersucht werden. So zeigte sich zum Beispiel in einer Arbeit von *Marczynke et al.*^[140], dass die Orientierung von Peptidliganden an Nukleinsäuregerüsten einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem Zielprotein ausüben kann.

4.4 Multivalente Präsentation bivalenter Binder

Auf Nukleinsäuregerüsten lässt sich die Anzahl und räumliche Orientierung von Liganden präzise einstellen. Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, können diese besonderen Eigenschaften genutzt werden, um den Hämagglutinin-Rezeptor strukturell zu charakterisieren und die Bedingungen für eine effiziente bivalente Anbindung an das Lektin zu ermitteln. Da der über die multivalente Verstärkung erzielbare Affinitätsgewinn auch von der Stärke der individuellen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung abhängt, wurden zunächst die Wechselwirkungen gegenüber einem HA-Trimer optimiert. Aufbauend auf den erhaltenen Erkenntnissen, sollen nun die bivalenten Ligandenanordnungen vielfach auf komplexeren DNA-Strukturen präsentiert werden, die durch unterschiedlich ausgeprägte Ordnungsgrade gekennzeichnet sind: i.) hochgradig geordnete DNA-Drei-Wege-Kreuzungen und ii.) statistisch verteilte, lineare und verzweigte DNA-Komplexe auf repetitiven DNA-Templaten, die mittels *Rolling-circle Amplification* (RCA) generiert werden.

4.4.1 DNA-Drei-Wege-Kreuzung

Eine DNA-Drei-Wege-Kreuzung, die auf jedem der drei DNA-Arme eine optimierte bivalente Ligandenanordnung aufweist, sollte eine verbrückende Wechselwirkung mit mehreren Hämagglutininen auf der viralen Oberfläche ermöglichen. Dadurch wurde sich im Vergleich zum bivalenten Binder eine weitere Steigerung der Affinität versprochen. Hierfür wurden drei DNA-Sequenzen nach Ebara *et al.*^[102] gewählt, sodass sie nach Hybridisierung die Kernregion der Drei-Wege-Kreuzung **3wj1** bilden (Abbildung 24A links). Pro Sequenz wurden zwei ungepaarte Nukleotide eingefügt, die in der Kreuzungsregion für weniger sterische Spannung und somit für eine höhere Komplexstabilität sorgen sollten. Die Integrität des ternären Komplexes wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht. Die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten bei Verwendung von einer, zwei und drei Sequenzen, deuten auf die Bildung des gewünschten ternären Komplexes hin (Abbildung 24B links). In Denaturierungsexperimenten wurde eine Schmelztemperatur von 44°C erhalten (Abbildung 24C links), was wiederum für die Bildung des gewünschten Komplexes spricht. Bei Raumtemperatur sollte das Gleichgewicht zwar auf Seiten des vollständig gebildeten Komplexes liegen, allerdings konnte die Komplexbildung in der PAGE und Denaturierungsanalyse nur in Gegenwart von 5 mM Magnesiumchlorid beobachtet werden, was für eine geringe Stabilität der Kernregion spricht.

Als nächstes wurden drei DNA-Sequenzen verwendet, die um 39 Nukleotide verlängert wurden. Diese überhängenden Nukleotidsequenzen sollten die Hybridisierungsstellen für drei komplementäre PNA-13mere kodieren und eine bivalente Ligandenanordnung pro DNA-Seitenarm ermöglichen. Auch hier zeigte die Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Bildung von nur einer

Bande, was für eine erfolgreiche Hybridisierung des verlängerten ternären Komplexes **3wj2** (Abbildung 24B, Mitte) spricht. Auch in Gegenwart der komplementären PNA-Oligomere zeigte sich im Gel nur eine Bande, die auf die gewünschte Bildung eines Komplexes **3wj3** aus den 12 einzelnen DNA- und PNA-Oligomeren hindeutet (Abbildung 24B, rechts). Interessanterweise konnten in der Denaturierungsanalyse des PNA·DNA-Komplexes zwei Schmelztemperaturen ermittelt werden (Abbildung 24C, rechts). Hierbei wird auf Grundlage der Voruntersuchungen die niedrigere Schmelztemperatur (46°C) der Dehybridisierung der Kernregion (3wj1) und die höhere Schmelztemperatur (63°C) den PNA·DNA-Duplexen zugeordnet. Der vollständig hybridisierte Komplex **3wj3** sollte sechs Sialyl-LacNAc-Liganden tragen. Dabei sollte der Abstand zwischen den Liganden auf einem DNA-Arm 17 Nukleotide ($\approx 59 \text{ \AA}$) betragen und somit eine bivalente Wechselwirkung mit einem Hämagglutinin-Trimer ermöglichen (Kapitel 4.2.4). Unter der Annahme einer planaren Anordnung der DNA-Drei-Wege-Kreuzung **3wj3** beträgt der kürzeste Abstand zwischen zwei Liganden unterschiedlicher Seitenarme etwa 87 \AA (Abbildung 24A, Mitte). Auf Grundlage von Ergebnissen die auf der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) beruhen und einer ungerichteten Orientierung der einzelnen Hämagglutinin-Trimere, wurde für die Abstände von zwei kanonischen Bindungsstellen auf benachbarten Hämagglutininen ein Bereich von $49\text{-}154 \text{ \AA}$ abgeschätzt.^[104] Demzufolge sollte es möglich sein, mit der entwickelten Drei-Wege-Kreuzung drei Hämagglutinine auf der viralen Oberfläche zu verbrücken (Abbildung 24A, rechts). Aufgrund der ungepaarten Nukleotide in der Kernregion der DNA-Kreuzung sollten ungünstige Anordnungen der Liganden kompensiert werden können. Das Inhibitionspotential des hexavalenten Komplexes wurde im Hämagglutinationstest untersucht. Darin zeigte sich im untersuchten Konzentrationsbereich des Komplexes ($0.1\text{-}250 \text{ }\mu\text{M}$) keine Inhibition der Hämagglutination. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten könnte mit der geringen Stabilität des Komplexes verbunden sein. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den vorherigen Ergebnissen im Hämagglutinationstest wurde auf die Zugabe von Magnesium-Ionen verzichtet, obwohl sich diese als günstig für die Komplexstabilität erwiesen haben. Dennoch sollten bei einer partiell dissoziiert DNA-Drei-Wege-Kreuzung bivalente PNA·DNA-Komplexe mit mikromolarer Affinität für das virale Hämagglutinin in Lösung vorliegen. Ein weiterer Faktor ist die geordnete Struktur des Komplexes, welche eine effektive Anbindung an den Virus verhindern könnte. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch das unmodifizierte PNA-Oligomer entfernt und somit die Flexibilität auf den Seitenarmen der DNA-Kreuzung durch jeweils 13 ungepaarte Nukleotide erhöht. Auch dieser Komplex zeigte keine Inhibition der Hämagglutination.

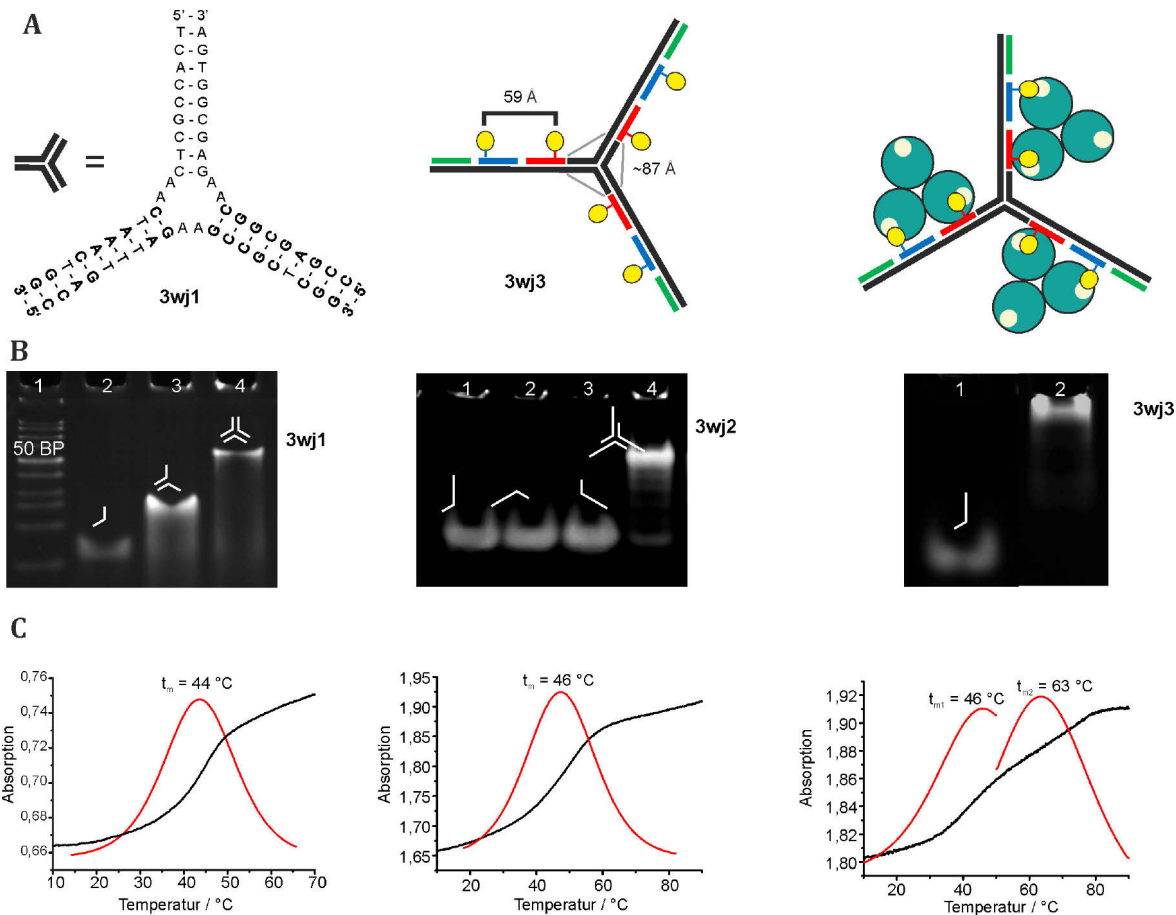


Abbildung 24: Bildung und Charakterisierung einer PNA-DNA-Drei-Wege-Kreuzung. (A) Kernregion der DNA-Drei-Wege-Kreuzung **3wj1** mit DNA-Sequenzen nach Ebara *et. al.*^[102] (links). PNA-DNA-Drei-Wege-Kreuzung **3wj3** mit Abständen zwischen zwei Trisaccharid-Liganden entlang eines DNA-Seitenarms und zwischen zwei DNA-Seitenarmen unter der Annahme einer planaren Anordnung der Kreuzung (Mitte). Schematische Darstellung der Bindung einer PNA-DNA-Drei-Wege-Kreuzung an drei Hämagglutinin-Trimere auf der viralen Oberfläche (rechts). (B) Polyacrylamid-Gelelektrophorese der DNA-Drei-Wege-Kreuzung **3wj1** ohne DNA-Überhang (links, 10% Polyacrylamid-Sammelgel; Trenngel: 20% Polyacrylamid, Laufpuffer: Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-Borat (89 mM, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), 100 V, 2 h, 5°C, SybrGold-Anfärbung), 1: DNA-Duplex-Marker, 2/3/4: eine/zwei/drei DNA-Sequenzen der **3wj1**. **3wj2** mit DNA-Überhang (Mitte, 8% Polyacrylamid; Laufpuffer: Tris-Borat (89 mM, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), 20 V, 4 h, 5°C, SybrGold-Anfärbung), 1/2/3: einzelne DNA-Sequenzen der **3wj2** und 4: Mischung aus allen drei DNA-Sequenzen. Komplex **3wj3** in Gegenwart komplementärer PNA-Oligomere (rechts, 4% Polyacrylamid-Sammelgel; Trenngel: 8% Polyacrylamid, Laufpuffer: Tris-Borat (89 mM, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), 20 V, 4 h, 5°C, SybrGold-Anfärbung); 1: einzelne DNA-Sequenz, 2: Mischung aus allen drei DNA-Sequenzen und komplementären PNA-Oligomeren. (C) Denaturierungsexperimente mit DNA-Drei-Wege-Kreuzungen: **3wj1** (ohne DNA-Überhang, links), **3wj2** (mit DNA-Überhang, Mitte) und **3wj3** (mit DNA-Überhang in Gegenwart komplementärer PNA-Oligomere, rechts). Die Absorption wurde bei 260 nm während eines Temperaturzyklus (drei Zyklen von 20-90°C in 0.5°C/min) bestimmt, die Wendepunkte berechnet und über alle Zyklen gemittelt. Bedingungen: 0.5 µM Komplex, 100 mM NaH₂PO₄ (pH 7.0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂. Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur (schwarze Linie) und erste Ableitung (rote Linie).

In einer weiteren erst kürzlich erschienenen Arbeit berichten *Ebara et al.*^[103] von der Ausweitung ihres zuvor präsentierten Konzepts auf Sialyl-Lactose-modifizierte DNA-Drei-Wege-Kreuzungen zur Inhibition des viralen Hämagglutinins (Kapitel 2.3, Abbildung 7C). Diese Untersuchung zeigt zum einen, dass eine mikromolare Inhibition auf trigonalen Strukturen unter Verwendung von nur einem Sialyl-Lactose-Liganden pro DNA-Arm möglich ist. Allerdings wurde die höchste Inhibition erst durch die gruppierte Anordnung von mehreren Liganden pro DNA-Arm (3 oder 9) erzielt. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Vorergebnisse sowie die Veröffentlichung von *Ebara et al.* haben zur Rückstellung dieses Vorhabens geführt.

4.4.2 Lineare und verzweigte multivalente PNA-DNA-Komplexe auf DNA-Concatemeren

In diesem Teil der Arbeit wurde das Ziel verfolgt, die durch DNA-programmierte räumliche Rasterung der Hämagglutinine erhaltenen optimalen bivalenten Ligandenanordnung auf repetitiven DNA-Templaten in großer Anzahl zu präsentieren und Bedingungen zu identifizieren, die eine hochpotente antivirale Inhibition ermöglichen. Dabei wurden lineare und verzweigte DNA-Strukturen in Betracht gezogen. Beide Ansätze setzten die Synthese von langen DNA-Templaten voraus.

4.4.2.1 Generierung und Charakterisierung der DNA-Concatemere

Eine leistungsstarke Methode zur Generierung langer repetitiver DNA-Strukturen ist die *Rolling-Circle Amplification* (RCA). Dabei handelt es sich um einen isothermalen Prozess, bei dem eine kurze Starter-DNA (engl. *primer*) mit einem zirkulären DNA-Templat hybridisiert und durch die Phi29-Polymerase (DNA pol) verlängert wird. Dabei wird die Starter-DNA immer wieder um die komplementäre DNA des zirkulären DNA-Templats ergänzt. Auf diese Weise können DNA-Concatemere mit Hunderten von Tandem-Wiederholungssequenzen hergestellt werden (Abbildung 25A). Aufgrund der hohen Vervielfältigungsrate einer initial geringen Menge an Starter-DNA wurde dieses Verfahren ursprünglich bei der sensitiven DNA-Detektion verwendet. Aber auch in anderen Bereichen, wie der DNA-Nanoassemblierung oder bei der Wirkstoffentwicklung, birgt die Anwendung dieser Methode großes Potential.^[141]

Als Templat für die RCA-Reaktion wird eine zirkuläre DNA benötigt. In dieser Arbeit sollte diese durch enzymatischen Zyklisierung eines 5'-Phosphat- und 3'-Endes einer linearen DNA durch die CircLigase™ erhalten werden. Dabei hängen nach Lieferantenangaben (Epicentre) die Zyklisierungsausbeuten unter anderem von der Art der terminalen Nukleotide, der Sequenzlänge und der

Dauer der enzymatischen Reaktion ab. Als vorteilhaft wurde die Kombination eines 2'-Desoxythymidin-5'-monophosphats am 5'-Terminus mit einem 2'-Desoxyguanosin am 3'-Terminus beschrieben. Eine Kettenlänge von 30-100 Nukleotiden stellt dabei einen Kompromiss zwischen einer moderaten Ringspannung und ausreichender räumlicher Nähe der beiden Strangenden dar. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich einzelsträngige DNA-Sequenzen der Länge von 39 und 50 Nukleotiden verwendet. Bei 60°C sollte die Zyklisierung nach wenigen Stunden abgeschlossen sein. Es wurde jedoch beobachtet, dass eine Reaktionsführung über Nacht zu höheren Zyklisierungsausbeuten führte. Nicht umgesetzte lineare DNA-Oligonukleotide wurden selektiv durch den Einsatz von Exonukleasen entfernt. Die Reaktion konnte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese verfolgt und quantifiziert werden. Aus der Analyse der Reaktionsmischung konnte das Verhältnis der beiden Bandenintensitäten bestimmt und somit die Zyklisierungsausbeute (60-95%) abgeschätzt werden (Abbildung 25B).

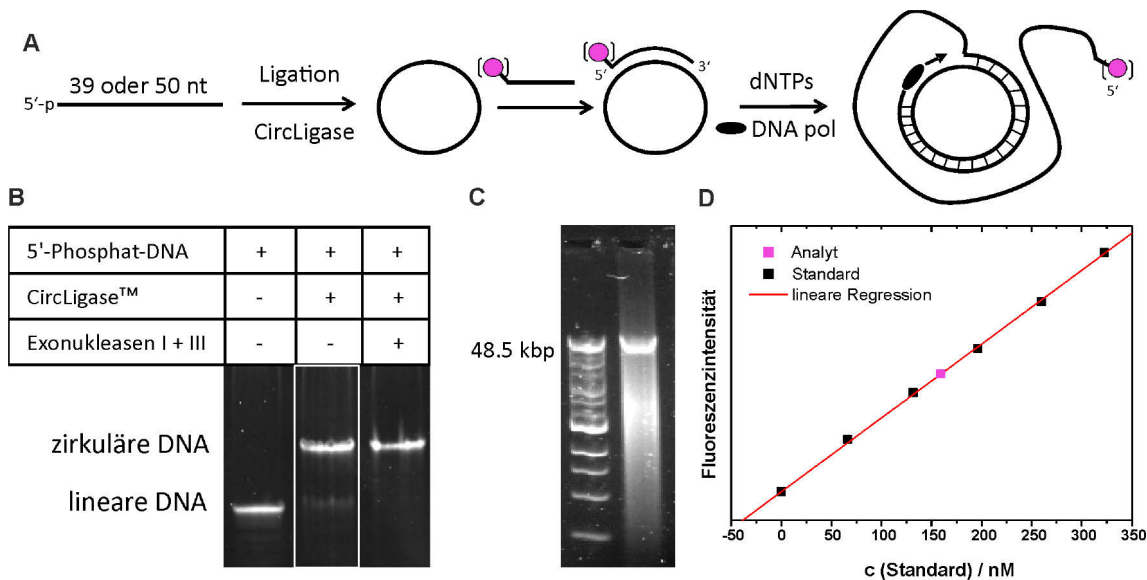


Abbildung 25: DNA-Zyklisierung und RCA zur Generierung von langen repetitiven DNA-Oligonukleotiden. (A) Reaktionsschema; (B) Reaktionskontrolle der DNA-Zyklisierung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese: lineare einzelsträngige DNA vor der Zyklisierung (links), Reaktionsmischung (Mitte), Zyklisierungsprodukt nach Behandlung mit Exonukleasen (rechts); Zyklisierungsausbeute 60-95%; 20% denaturierendes Polyacrylamid-Gel und Visualisierung mittels SybrGold-Anfärbung; (C) Agarose-Gel einer erweiterten 1kb DNA-Leiter (links) und des RCA-Produkts RCA_3 (rechts). Alle hergestellten RCA-Produkte RCA_x zeigten im Agarose-Gel eine ähnliche Mobilität; Bedingungen: 0.6% Agarose, 1x Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE)-Puffer, 80 V, 2 h, SybrGold-Anfärbung; (D) Fluoreszenzintensitäten kurzer Cy3-markierter DNA-Stränge bei verschiedenen Konzentrationen (schwarze Quadrate) und Cy3-markierten RCA-Produktsträngen (pinkes Quadrat).

Ohne weitere Aufreinigung konnte nun die RCA-Reaktion durchgeführt werden. Zur zirkulären DNA wurde eine kurze komplementäre Starter-DNA (≈ 20 Nukleotide), eine Mischung von Des-

oxynukleotidtriphosphaten (dNTPs), der Reaktionspuffer und Repliphi29-DNA-Polymerase hinzugefügt und bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde vollzogen bis eine deutliche Bande im Agarose-Gel die Bildung eines hochmolekularen RCA-Produkts bestätigte (Abbildung 25C). Auffallend war die charakteristisch hohe Viskosität der Reaktionsmischung. Der Reaktionsansatz wurde mithilfe des *High Pure PCR Purification Kit* der Firma Roche aufgereinigt. Dabei wurde die Reaktionslösung in Gegenwart des chaotropisch wirkenden Guanidiniumthiocyanats auf ein mit Glasfasern gepacktes Filterröhrchen aufgetragen. Längere DNA-Sequenzen (>100 Nukleotide) binden selektiv an dem Säulenmaterial und überschüssige Starter-DNA, Nukleotide und Salze werden in mehreren Waschschritten entfernt. Das gereinigte Produkt wird anschließend mit einem Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) von der Säule eluiert. Durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm konnte die Gesamtmasse an hergestelltem RCA-Produkt abgeschätzt werden (Kapitel 6.2.5.2). So führte beispielsweise der Einsatz von 40 pmol zirkulärer DNA zu 50 µg RCA-Produkt. Wenn jedes Molekül zirkulärer DNA zu einem RCA-Produktstrang umgesetzt werden würde, könnte darüber die Länge eines RCA-Produktstranges ermittelt werden. Da aber die kurze Starter-DNA im deutlichen Überschuss (100-fach) zu der zirkulären DNA eingesetzt wurde, besteht die Möglichkeit, dass bereits gebildete RCA-Stränge durch Starter-DNA vom zirkulären Templat verdrängt werden und dadurch ein neuer DNA-Tandem-Strang generiert wird. Eine verlässliche Aussage über die Länge eines RCA-Produktstranges ist somit auf diesem Weg schwierig.

Die Mobilität der RCA-Produkte in der Gel-Elektrophorese deutet auf das Vorhandensein hochmolekularer Verbindungen und damit auf eine erfolgreiche RCA-Reaktion hin. Allerdings ist eine Abschätzung der Länge der Oligonukleotidstränge mit Hilfe dieser Technik mit großen Ungenauigkeiten verbunden. Aus diesem Grund wurden die RCA-Produkte in Zusammenarbeit mit Valentin Reiter-Scherer (AG Rabe, HU Berlin) mit einem Rasterkraftmikroskop untersucht. Hierzu wurden zunächst frisch präparierte Glimmerplatten mit positiv-geladenem Poly-Ornithin beschichtet und anschließend das RCA-Produkt (2 µg/mL, PBS-Puffer, pH 7.4) aufgetragen. Nach wenigen Minuten wurde der Überstand an einem Zentrifugalbeschichter (engl. *spin-coater*) entfernt und anschließend mit Wasser gewaschen. Die erhaltene Aufnahme zeigt gestreckte Strukturen im Mikrometer-Bereich (Abbildung 26A). In einer Analyse der Konturlängen von 12 ausgewählten Strängen wurde eine mittlere Länge von 6 ± 2 µm erhalten (Abbildung 26B). Da lange einzelsträngige DNA in Lösung zu instabilen Strukturen tendiert, bildet sie leicht intermolekulare Strukturen größerer Ordnung aus. Dieses würde auch Verzweigungen erklären, die erst in detaillierteren Aufnahmen der untersuchten Strukturen deutlich werden (Abbildung 26C und D). Daher sollten die ermittelten Konturlängen nicht auf die Länge der Einzelstränge bezogen werden. Ununterbrochene

Stränge der Länge von $0.3\ \mu\text{m}$ (weißer Pfeil in Abbildung 26C) sind allerdings problemlos zu identifizieren. Unter der Annahme einer mittleren Länge von $0.068\ \text{nm}$ pro Nukleotid^[142] würde dies einer Anzahl von etwa 1400 Nukleotiden (≈ 28 oder 36 Tandemwiederholungen) entsprechen.

Eine weitergehende Quantifizierung der RCA-Produkte ermöglichte der Einsatz von Cy3-markierter Starter-DNA. Nach Aufreinigung des RCA-Produkts konnte mittels Kalibrierung mit einem Cy3-markierten Oligonukleotid, die Konzentration an Cy3-markierten Produktsträngen bestimmt werden (Abbildung 25D). Es zeigte sich, dass die Stoffmenge an Produktsträngen wie erwartet die der zirkulären DNA übertraf, beide aber in ähnlicher Größenordnung vorlagen. Die mittlere Stranglänge wurde aus dem Verhältnis der optischen Dichte und der Fluoreszenzintensität der Cy3-markierten RCA-Produkte abgeschätzt (Kapitel 6.2.5.2). Daraus ergaben sich Längen von 1825 Nukleotiden (≈ 46 Wiederholungen, mittlere molare Masse $\approx 566000\ \text{g/mol}$) und 750 Nukleotiden (≈ 15 Wiederholungen, mittlere molare Masse $\approx 228000\ \text{g/mol}$) für die Cy3-markierten RCA-Produkte, die Tandemsequenzen von 39 beziehungsweise 50 Nukleotiden enthalten.

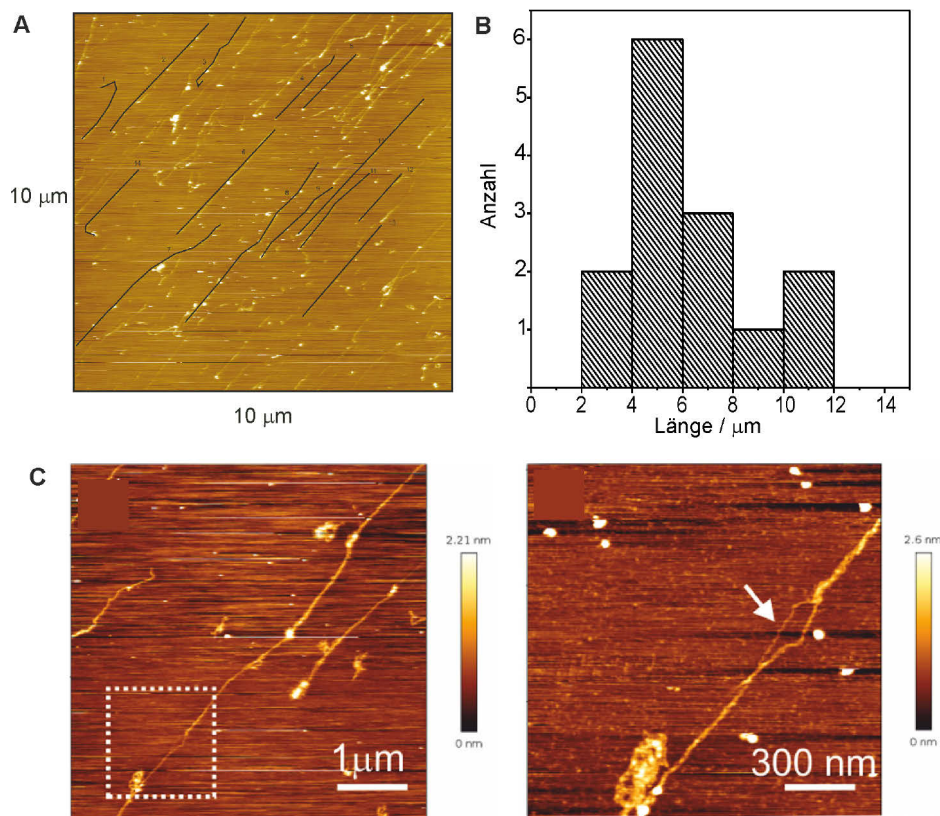


Abbildung 26: Rasterkraftmikroskopie (SFM, engl. *scanning force microscopy*) der RCA-Produkte. (A) Auswahl von 12 Strukturen zur Bestimmung von Konturlängen. (B) Histogramm der 12 ermittelten Konturlängen. Als mittlere Länge wurden $6 \pm 2\ \mu\text{m}$ bestimmt. (C) Vergrößerte Ausschnitte aus (A) zeigen aggregierte Strukturen mit vereinzelt Verzweigungen. Der weiße Pfeil deutet auf einen einzelsträngigen Bereich einer Länge von etwa $0.3\ \mu\text{m}$. Die SFM-Aufnahmen wurden von Valentin Reiter-Scherer (AG Rabe, HU Berlin) aufgenommen.^[143]

In einem Kontrollexperiment wurde die Sequenz der zirkulären DNA derart erweitert, dass das entstehende RCA-Produkt repetitiv Restriktionsschnittstellen aufweisen sollte. Die einzelsträngige DNA wurde zunächst zyklisiert und anschließend die komplementäre DNA in einer RCA vervielfältigt (Abbildung 27A). Nach Zugabe des Restriktionsenzym Alu I sollte das RCA-Produkt auf diese Weise fragmentiert werden (Experimenteller Teil, Kapitel 6.2.5.3). Während vor der Reaktion noch eine deutliche Bande im hochmolekularen Bereich zu sehen war, spricht das Ausbleiben dieser Bande nach Behandlung mit dem Enzym Alu I für den Verdau des RCA-Produkts (Abbildung 27B). Das Auftreten niedrigmolekularer Fragmente im Polyacrylamid-Gel zeigte außerdem die Bildung von kürzeren DNA-Fragmenten was für eine erfolgreiche partielle Restriktion spricht (Abbildung 27C).

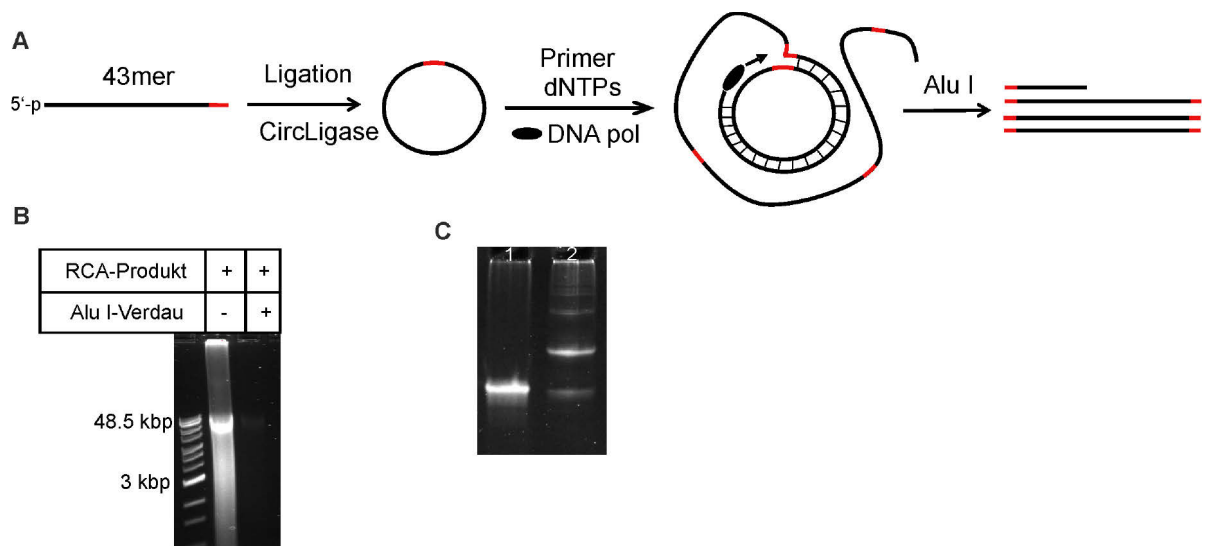


Abbildung 27: Enzymatischer Verdau eines RCA-Produkts. (A) Reaktionsschema, (B) Agarose-Gelelektrophorese des RCA-Produkts: verlängerte 1 kbp doppelsträngige DNA-Leiter (links), RCA-Produkt vor dem enzymatischen Verdau (Mitte) und nach dem enzymatischen Verdau durch Alu I (rechts). Bedingungen: 0.5% Agarose, 1x Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (TBE)-Puffer, 80 V, 2 h, SybrGold-Anfärbung. (C) Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer Oligonukleotid-Referenz (43 nt) (1) und RCA-Produkt nach dem enzymatischen Verdau (2). Bedingungen: 20% PAGE, 1xTBE, 100 V, 2 h, SybrGold-Anfärbung.

4.4.2.2 Lineare und verzweigte Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe auf RCA-Produkten

Die Sequenzen der zirkulären DNA wurden derart gewählt, dass die repetitiven RCA-Produkte Template für lineare und verzweigte Komplexe bilden können. Im ersten Fall kodiert eine Tandemsequenz von 39 Nukleotiden Hybridisierungsstellen für zwei Trisaccharid-modifizierte Sialyl-

LacNAc-PNA-Oligomere (**PNA2** und **PNA3**) und ein unmodifiziertes PNA-Oligomer **PNA1** (Abbildung 28A). Die Synthese der verwendeten Trisaccharid-PNA-Konjugate wurde in Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 vorgestellt. Deren vielfache lineare Hybridisierung entlang des RCA-Produktstranges gestattet die Verknüpfung multipler PNA-Trisaccharid-Konjugate.

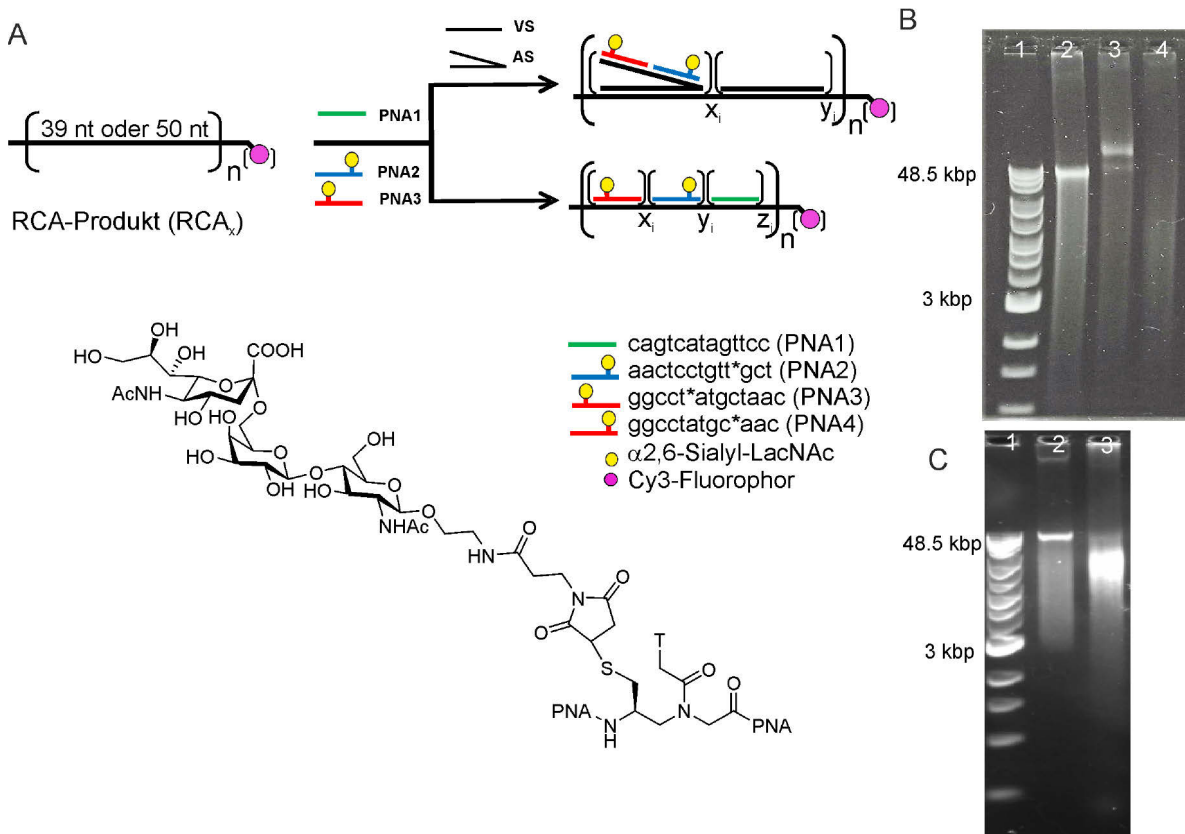


Abbildung 28: Lineare und verzweigte Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe. (A) Hybridisierung von Sialyl-LacNAc-modifizierten (rot, blau) und unmodifizierten (grün) PNA-Oligomeren auf RCA-Produktsträngen mit einer DNA-Tandemsequenz von 39 Nukleotiden führt zu einer linearen Ligandenanordnung. Hybridisierung von modifizierten (rot, blau) PNA-Oligomeren, DNA-Adaptersträngen **AS**, DNA-Versteifersträngen **VS** und RCA-Produktsträngen mit einer DNA-Tandemsequenz von 50 Nukleotiden führt zu einer verzweigten Darstellung der bivalenten Glykoliganden. ($x; y; z$) = 1 oder 0, mit $i = 1, 2, \dots, n$; n entspricht der Anzahl an DNA-Tandemwiederholungen; (B) Analyse der elektrophoretischen Mobilität der linearen Komplexe: erweiterte 1 kbp doppelsträngige DNA-Leiter (1), aufgereinigtes RCA-Produkt (2), Komplex aus PNA-Oligomeren und RCA-Produkt (3), wie in Spur 3, aber mit fünffacher Menge an PNA-Oligomeren (4). (C) Analyse der elektrophoretischen Mobilität der verzweigten Komplexe: erweiterte 1 kbp doppelsträngige DNA-Leiter (1), aufgereinigtes RCA-Produkt (2), Komplex aus PNA-Oligomeren, DNA-Strängen **AS** und **VS** sowie RCA-Produkt (3). Bedingungen: 0.6% Agarose-Gel, 1xTBE-Puffer, 50 V, 2 h, SybrGold-Detektion.

Die längere Tandemsequenz von 50 Nukleotiden wurde derart gewählt, dass sie die Hybridisierung eines komplementären 25-nt DNA-Adapterstranges (**AS**) erlaubt, dessen 26-nt DNA-Überhang wiederum für zwei PNA-13mere kodiert. Werden mehrere Adapterstränge über verzweigte

Hybridisierung angebunden, führt dies zu einer büstenartigen Struktur. Ein einzelsträngiger Bereich von 25 Nukleotiden zwischen benachbarten DNA-Adaptersträngen sorgt für Gerüstflexibilität oder kann mit einem komplementären DNA-Versteiferstrang **VS** (23 nt) rigidifiziert werden. Beide Gerüsttypen gestatten die multiple Präsentation der bivalenten Sialyl-LacNAc-Liganden im Abstand von 17 nt, der sich in vorherigen Untersuchungen als optimal für die simultane Anbindung an zwei Bindungsstellen eines Hämagglutinin-Trimers erwiesen hat.

Die Komplexbildung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. In Spur 2 des gezeigten Gels (Abbildung 28B) wurde das DNA-Templat für die linearen Komplexe aufgetragen, welches eine deutliche Bande im hochmolekularen Bereich zeigt. Um eine Hybridisierung der PNA-Oligomere mit dem RCA-Produkt zu gewährleisten, werden diese vermischt, auf 75°C erhitzt und anschließend innerhalb von 20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. In Spur 3 ist zu erkennen, dass die Intensität der Bande auf Höhe des RCA-Produkts abgenommen hat und stattdessen eine neue Bande im größeren Massenbereich entstanden ist. Aufgrund des größeren Molekulargewichts und einer geringeren Polarität lässt sich die verringerte Mobilität des linearen PNA·DNA-Komplexes im Gel nachvollziehen. In Spur 4 wurde der Anteil der PNA-Oligomere weiter erhöht. Erfahrungsgemäß lassen sich vollständig gepaarte PNA·DNA-Duplexe nicht mehr mit dem interkalierenden SybrGold anfärben. Daher kann das Ausbleiben einer Bande als Zeichen für vollständige Hybridisierung gewertet werden. Analog werden für verzweigte Komplexe äquimolare Mengen an DNA-Adaptersträngen (mit und ohne DNA-Überhang) und PNA-Oligomeren vermischt, zum RCA-Produkt gegeben, auf 75°C erhitzt und durch langsames Abkühlen miteinander hybridisiert. Auch hier wird eine deutliche Bande in der Agarose-Gelelektrophorese für das RCA-Produkt erhalten (Abbildung 28C, Spur 2). Im Gegensatz zu den linearen Komplexen, lässt sich in Spur 3 aber eine Verschiebung der Bande nach unten erkennen. Es wurde erwartet, dass die elektrophoretische Mobilität des PNA·DNA-Komplexes in Relation zum RCA-Produkt erschwert ist. Da es sich um ein natives Gel handelt, ist nicht auszuschließen, dass intermolekulare Wechselwirkungen der RCA-Stränge zu Aggregationen führen, wie sie bereits in SFM-Aufnahmen (Abbildung 26C) beobachtet wurden und ein schweres RCA-Produkt im Polyacrylamid-Gel suggerierten. Durch Zugabe der komplementären Stränge könnte es zur Auflösung dieser Aggregate gekommen sein, wodurch sich die unerwartete Mobilitätsveränderung in Spur 3 erklären ließe.

4.4.2.3 Untersuchung der Wechselwirkungen linearer und verzweigter Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe mit Influenza A-Viren

Wie im Kapitel 4.2.4 beschrieben, wird im Hämagglutinationsinhibitionstest eine Konzentration von 50-60 mM des monovalenten, unkonjugierten Trisaccharids (α 2,6-SLN **17** und α 2,6-SL) benötigt, um eine Agglutination des IAV X31 zu verhindern. Das optimierte bivalente Trisaccharid-PNA-DNA-Konjugat **NA59** sorgte für eine 680-fache Verstärkung der Inhibition pro Zucker ($K_i^{\text{HA1}}(\text{SLN}) = 88 \mu\text{M}$). Wie im vorherigen Kapitel vorgestellt wurde, wurden die linearen und verzweigten Komplexen so konzipiert, dass die bivalenten Liganden, entweder linear entlang eines DNA-Templats oder verzweigt in einer büstenartigen Struktur angeordnet werden. Da auf der Oberfläche von Influenza-Viren eine hohe Dichte an HA-Trimeren vorliegt, sollten hohe Bindungsaffinitäten und eine Untersuchung der dafür notwendigen Bedingungen durch die simultane Verbrückung einer Vielzahl von Trimeren möglich sein.

Abhängigkeit der Inhibition von humanen Influenza A-Viren von der Beladung und Flexibilität der langen DNA-Templates

Die optimale Menge an eingesetzten PNA-Trisaccharid-Konjugaten, die nötig ist, um eine möglichst hohe und effektive Inhibition der Agglutination des IAV X31 zu erreichen, ist nicht offensichtlich. Zum einen ist die Bildung stabiler Duplexe von der Konzentration der einzelnen Nukleinsäuren abhängig. Außerdem werden die PNA-Trisaccharid-Konjugate und DNA-Adapterstränge mit großer Wahrscheinlichkeit statistisch entlang des DNA-Rückgrats hybridisieren, was dazu führen könnte, dass erst bei einer ausreichend hohen Beladung des DNA-Rückgrats mit PNA-Oligomeren gewinnbringende Wechselwirkungen mit der viralen Oberfläche erzielt werden können. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verhältnisse von Trisaccharid-PNA zu RCA-Produktsträngen (SLN/RCA) auf ihr Inhibitionspotential getestet (1000-16000 pmol SLN per μg RCA-Produkt für die verzweigten Komplexe (BX000) und 1300-21700 pmol SLN per μg RCA-Produkt für die linearen Komplexe (LXX00), Abbildung 29 und Tabelle 5). Erwartungsgemäß zeigten die RCA-Produkte in Abwesenheit von Trisaccharid-PNA-Oligomeren, beziehungsweise in Komplex mit den DNA-Adaptersträngen, keine virale Inhibition (Experimenteller Teil, Tabelle 19).

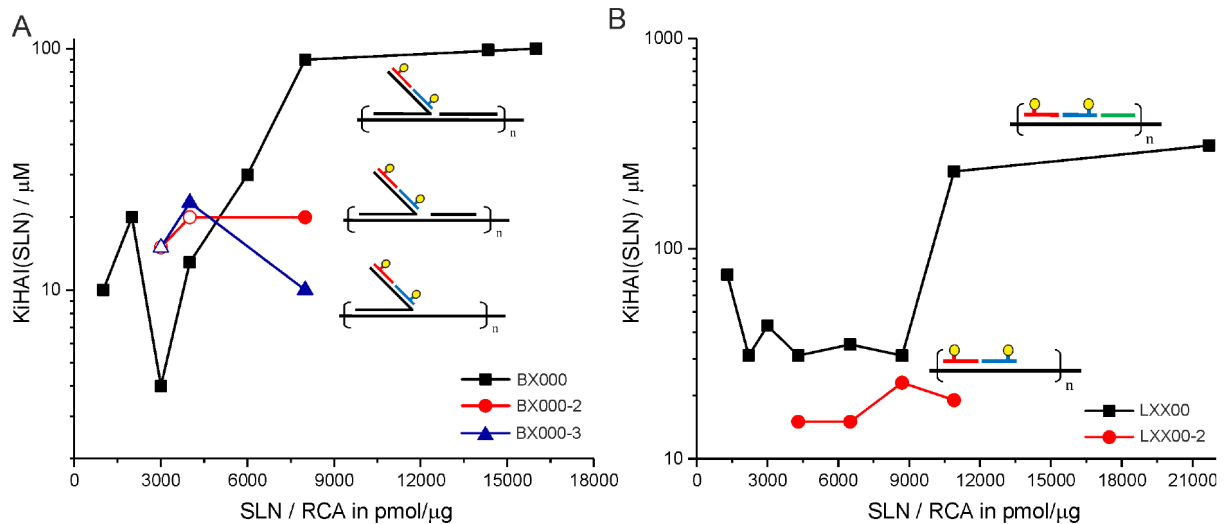


Abbildung 29: Inhibition von Influenza X31-induzierter Hämagglutination durch Sialyl-LacNAc-PNA-Oligomere auf RCA-Templatsträngen bezogen auf die Konzentration der Trisaccharide am $K_i^{HAI}(SLN)$. (A) Verzweigte Komplexe mit DNA-Versteifersträngen von 23 Nukleotiden (BX000), 15 Nukleotiden (BX000-2) und ohne DNA-Versteiferstränge (BX000-3). (B) Lineare Komplexe mit (LXX00) und ohne (LXX00-2) versteifendem, unmodifiziertem PNA-Oligomer (PNA1). Nicht ausgefüllte Symbole bedeuten, dass keine Inhibition der Hämagglutination bei der getesteten Konzentration erreicht wurde.

Zunächst werden die Komplexe **B1000-B16000** mit verzweigter Ligandenpräsentation untersucht. Da die Liganden auf den DNA-Adaptersträngen hybridisieren, sollten selbst bei überschüssigen PNA-Trisaccharid-Konjugaten in Relation zum RCA-Templat bivalente Anordnungen ähnlich des **NA59**-Duplexes in Lösung vorliegen. Aus diesem Grund sollte bei hohen Beladungen theoretisch der $K_i^{HAI}(SLN)$ nicht höher als der $K_i^{HAI}(NA59)$ sein. Tatsächlich erreichten die experimentell ermittelten Werte, unabhängig von dem SLN/RCA-Verhältnis und im Rahmen des Messfehlers, keinen $K_i^{HAI}(SLN) > 100 \mu M$. Interessanterweise wurde die höchste Inhibition nicht mit der höchsten SLN/RCA-Beladung erreicht (Abbildung 29A links, schwarze Quadrate, Tabelle 5). In dieser Serie zeigte der Komplex **B3000**, mit einer Beladung von 3000 pmol SLN per μg RCA-Produkt, eine um vier Größenordnungen höhere Inhibition ($K_i^{HAI}(SLN) = 4 \mu M$, Tabelle 5) als das monovalente Trisaccharid. Für Beladungen von SLN/RCA $> 3000 \text{ pmol}/\mu g$ sank die effektive Inhibition in Bezug zur eingesetzten Menge an Zucker für SLN. Beispielsweise wurde bei SLN/RCA = 16000 $pmol/\mu g$ deutlich mehr Trisaccharid benötigt (25-fach), um eine virale Inhibition zu erreichen ($K_i^{HAI}(SLN) = 100 \mu M$). Unter der Annahme einer mittleren Länge von 750 nt, die für das Cy3-markierte RCA-Produkt bestimmt wurde, kann für **B3000** ein K_i^{HAI} -Wert in Bezug auf die DNA-Moleküle von $K_i^{HAI}(RCA) = 6 \text{ nM}$ angegeben werden (Tabelle 5 und Kapitel 6.4). In Anbetracht der verwendeten Konzentration an Virus von zwei hämagglutinierenden Einheiten (HAU) erreicht diese Inhibitionskonstante fast den niedrigsten K_i^{HAI} -Wert von 2 nM, der im Rahmen dieses Assays gemessen

werden kann.^[34] In Relation zum monovalenten Zucker **17** bedeutet dies eine 10^7 -fache Verstärkung des Inhibitions potentials. Allerdings beruht dieser Wert auf der Annahme, dass RCA-Reaktionen mit und ohne Cy3-markierten Strängen zu Produkten mit vergleichbaren Stranglängen führen. Weiterhin kann festgestellt werden, dass eher hohe Beladungen an PNA-Trisaccharid-Konjugaten und DNA-Adaptersträngen notwendig waren. Diese Beobachtung könnte im Zusammenhang mit i) einer hohen Anzahl an Hybridisierungsstellen (langen DNA-Templaten), ii) sterischer Behinderung der Hybridisierung und/oder iii) der Bildung von multivalenten PNA-Strukturen höherer Ordnung ohne Einbezug der komplementären Templat-DNA stehen.^[143] In einem Kontrollexperiment konnte die letztgenannte Möglichkeit ausgeschlossen werden. Darin wurde das Inhibitions potential einer Mischung aus Trisaccharid-PNA-Oligomeren und nicht-komplementärem RCA-Produkt untersucht. Wie erwartet blieb für alle getesteten SLN/RCA-Verhältnisse eine Inhibition aus (Experimenteller Teil, Tabelle 19), was zeigt, dass komplementäre DNA-Templates eine Voraussetzung für effektive multivalente Inhibition darstellen. In weiteren Experimenten wurde der sterische Anspruch der Komplexe verringert, indem die Flexibilität des DNA-Templates erhöht wurde. Weder eine Verkürzung der Versteiferstrang-DNA **VS** noch dessen vollständige Entfernung resultierte in einer höheren Inhibition (Tabelle 5 und Abbildung 29A, **B3000-2** und **B300-3**). Daher ist davon auszugehen, dass die verzweigten Komplexe bereits ausreichend Flexibilität aufweisen, um ungünstige sterische Anordnungen zu verhindern. Da die Punkte II und III durch Kontrollexperimente widerlegt werden konnten, wird die hohe Anzahl an zur Verfügung stehenden Hybridisierungsstellen als wahrscheinliche Ursache für die Notwendigkeit hoher Beladungen an PNA-Trisaccharid-Konjugaten und DNA-Adaptersträngen betrachtet. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass das DNA-Templat eine Länge von unter 750 nt aufweist. Eher handelt es sich bei dem K_i^{HAI} (RCA)-Wert von 6 nM um eine obere Grenze.

In weiteren Experimenten wurde der bivalente Binder derart oligomerisiert, dass die Liganden einen Abstand von 12 nt ($\approx 42 \text{ \AA}$) aufwiesen. Dazu wurde anstelle von **PNA3** das sequenzanaloge PNA-Oligomer **PNA4** verwendet, wobei die Position des Zuckerliganden von Position 9 auf 4 verändert wurde. Daraus resultiert bei benachbarter Hybridisierung der beiden PNA-Oligomere **PNA2** und **PNA4** eine Änderung des Abstandes von 59 \AA zu 42 \AA . In Kapitel 4.2 konnte bereits demonstriert werden, dass definiert-separierte Liganden eine Voraussetzung für eine effektive bivalente Bindung an das Hämagglutinin darstellen. Dabei bewies Komplex **NA59**, bei dem die zwei Trisaccharide durch 17 nt ($\approx 59 \text{ \AA}$) voneinander separiert werden, eine um mindestens den Faktor 11 stärkere Inhibition als **NA42** mit einem Abstand von 12 Nukleotiden zwischen den Liganden ($\approx 42 \text{ \AA}$) ($K_i^{\text{HAI,SLN}}$ (NA59) = 88 μM und $K_i^{\text{HAI,SLN}}$ (NA42) > 1000 μM , Tabelle 5). Dieses Ergebnis wurde damit begründet, dass bei Komplex **NA42** der Abstand zwischen den Liganden zu klein ist für eine bivalente Anbindung an die kanonischen Bindungsstelle des Hämagglutinins. Daher ist es bemer-

kenswert, dass für die multivalente Präsentation des Komplexes **NA42** auf rigidifizierten und flexibleren Gerüsten (B4000-42A und B4000-3-42A) jeweils hohe Inhibition erhalten wurde ($K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN}) = 20 \mu\text{M}$, Tabelle 5). Das bedeutet, dass die multivalente Präsentation auf verzweigten Gerüsten das Potential besitzt, einen schwachen, ungeeigneten bivalenten Binder in einen starken Binder zu verwandeln. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Flexibilität der verzweigten Komplexe die Genauigkeit der bivalenten Präsentation beeinflussen.





Von den linearen Komplexen **L1300-L21700** wurde erwartet, dass diese eine präzisere Ligandenpräsentation ermöglichen, da die PNA-Trisaccharid-Konjugate in diesem Fall direkt auf dem DNA-Templat hybridisieren und die bivalenten Binder generieren. Als Konsequenz müsste in diesem Fall der $K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN})$ -Wert nach vollständiger Hybridisierung deutlich höhere Werte annehmen. In Übereinstimmung mit dieser Überlegung, wurden für große SLN/RCA-Verhältnisse hohe $K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN})$ -Werte erhalten (Tabelle 5 und Abbildung 29B, L10900 und L21700). Optimale Inhibition von 31-43 μM wurde für Verhältnisse von 1160-4580 pmol/ μg erhalten. Die oligomerisierte Präsentation von bivalenten Bindern in Abständen von 12 nt ($\approx 42 \text{ \AA}$) im Unterschied zu 17 nt ($\approx 59 \text{ \AA}$) führte zu einem deutlichen Abfall des Inhibitionspotentials ($K_i^{\text{HAI,SLN}}(\text{L8700-42A}) > 124 \mu\text{M}$, Tabelle 5). Offensichtlich beruhte die Inhibition in diesem Fall auf dem Abstand zwischen den beiden Liganden, der sich nach benachbarter Hybridisierung ergibt. Daher kann festgehalten werden, dass bei den linearen Komplexen die Abstandsabhängigkeiten stärker ausgeprägt sind als bei den verzweigten Komplexen.




Auch bei den linearen Komplexen wurde der Einfluss der Gerüstflexibilität untersucht. Im Gegensatz zu den verzweigten Komplexen verbesserte die Abwesenheit des versteifenden PNA-Oligomers **PNA1** die Inhibition (**L4300-2**, **L6500-2**, **L8700-2**, **L10900-2**, Abbildung 29B, rote Kreise; Tabelle 5) in Relation zu den rigideren Varianten. Eine bemerkenswerte Steigerung der Inhibition (12-fach) konnte für den hochbeladenen Komplex **L10900-2** verzeichnet werden, dessen rigide Variante (**L10900**) den schwächsten Komplex in dieser Reihe darstellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der verzweigten Komplexen, inhibierte Komplex **L8700-2** (17 nt zwischen den Liganden) genauso effektiv wie Komplex **L8700-2-42A** (12 nt zwischen den Liganden). Erneut wird deutlich, dass Gerüstflexibilität zum Verlust der Abhängigkeit der Inhibition vom Abstand der bivalenten Liganden führt. Unter Annahme einer mittleren Länge von 1825 nt pro DNA-Templat kann für die potentesten linearen Komplexe **L4300-2** bis **L10900-2** ein K_i^{HAI} -Wert bezogen auf die DNA-Moleküle von 3-7 nM bestimmt werden (Tabelle 5). Damit konnte eine ähnlich starke Inhibition wie mit Komplex **B3000** erreicht werden. Es stellt sich die Frage, weshalb der verzweigte Komplex dafür weniger Beladung mit PNA-Trisaccharid benötigt. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang damit, dass die dabei verwendeten RCA-Template mit 50 nt pro Tan-

demwiederholung länger sind als die mit 39 nt-Tandemwiederholungen und dadurch mehr Hybridisierungsstellen zur Verfügung stellen. Die Auswirkungen verschiedener DNA-Templatlängen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht systematisch untersucht. Beispielsweise könnten RCA-Produkte diverser Längen durch Reaktionszeiten von wenigen Minuten bis Stunden erhalten werden. Eine Analyse der verschiedenen Produkte könnte durch Messung ihrer optischen Dichte und Fluoreszenzintensität sowie Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität erfolgen.

Die multivalenten Wechselwirkungen zwischen den Zuckerliganden und der viralen Oberfläche könnten auch durch sterische Abschirmung beeinflusst werden. So wäre es vorstellbar, dass nach Anbindung des multivalenten Komplexes an den Virus, dieser durch das lange DNA-Templat vor einer Wechselwirkung mit Erythrozyten abgeschirmt wird. Allerdings konnte in Kontrollexperimenten mit bivalenten Komplexen gezeigt werden, dass DNA-Überhänge das Inhibitionspotential dieser Binder negativ beeinflussten (Experimenteller Teil: Tabelle 16 und Tabelle 19). Da auch die oligomerisierten bivalenten Binder bei Komplexen mit geringen Beladungen nur schlechte Inhibition zeigten (Tabelle 5, Abbildung 29), wird deutlich, dass raumerfüllende DNA-Strukturen die Inhibition nicht zwangsläufig begünstigen.

Tabelle 5: Inhibition der viralen Hämagglutination von monovalentem Sialyl-LacNAc, bivalenten PNA·DNA-Duplexen und multivalenten PNA·DNA-Komplexen auf linearen und verzweigten DNA-Templaten.

		SLN/RCA [pmol/μg] ^[a]	K _i ^{HAI} (SLN) [μM] ^[b]	K _i ^{HAI} (RCA) [nM] ^[b,c]					SLN/RCA [pmol/μg] ^[a]	K _i ^{HAI} (SLN) [μM] ^[b]	K _i ^{HAI} (RCA) [nM] ^[b,d]	
SialylLacNAc	SLN	-	60000	-					L1300	1300	75	110
	B1000	1000	10	44					L2200	2200	31	27
	B2000	2000	20	44					L3000	3000	43	27
	B3000	3000	4	6					L4300	4300	31	14
	B4000	4000	13±3	14±3					L6500	6500	35±7	10±2
	B6000	6000	30	22					L8700	8700	31	7
	B8000	8000	90±70	50±39					L10900	10900	233±109	41±19
	B16000	16000	100±60	28±17					L21700	21700	310	27
	B3000-2	3000	>15	>22					L4300-2	4300	15	7
	B4000-2	4000	>20	>22					L6500-2	6500	15±9	4±2
	B8000-2	8000	20	11					L8700-2	8700	23±8	5±2
	B3000-3	3000	>15	>22					L10900-2	10900	19	3
	B4000-3	4000	23±6	25±7					NA59	-	88	-
	B8000-3	8000	10	6					NA42	-	>1000	-
	B4000-42A	4000	20	22					L8700-42A	8700	>124	>27
	B4000-3-42A	4000	20	22					L8700-2-42A	8700	23±8	5±2

 PNA-Oligomere;  DNA-Template,  Sialyl-LacNAc; K_i^{HAI} > x bedeutet, dass keine Inhibition der viralen Hämagglutination mit einer Konzentration des Liganden (RCA-Produkts) ≤ x erreicht wurde. [a] Diese Werte beziehen sich auf die Menge an Trisaccharid per Masse an Tandemwiederholungen. [b] Für Werte ohne Fehlerangaben wurde die Inhibition der Hämagglutination wiederholt bei identischen Konzentrationen beobachtet. [c] Diese Werte basieren auf der Annahme, dass das RCA-Produkt eine mittlere Länge von 750 nt aufweist (≈ molare Masse M = 228000 g/mol). [d] Diese Werte basieren auf der Annahme, dass das RCA-Produkt eine mittlere Länge von 1825 nt aufweist (≈ M = 566000 g/mol).

Untersuchung der serospezifischen Inhibition von linearen und verzweigten Komplexen auf RCA-Produkt-Templaten

In den obigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die flexibleren verzweigten Komplexe **B1000-B6000** eine bessere Inhibition bezogen auf die eingesetzten Liganden zeigten als die linearen Komplexe **L1300-L21700**. Eine Erhöhung der Gerüstflexibilität in den linearen Komplexen **L4300-2** bis **L10900-2**, welche durch Weglassen des versteifenden PNA-Oligomers **PNA1** erreicht wurde, verbesserte deren Inhibition. Dies deutet daraufhin, dass Gerüstflexibilität für die Adaption an die virale Oberfläche von besonderer Bedeutung ist. Allerdings sollte die Flexibilität nicht zu groß gewählt werden, um unspezifische Wechselwirkungen mit anderen potentiellen Sialinsäure-Rezeptoren zu vermeiden.

In Kapitel 4.2.4 wurde demonstriert, dass der bivalente Komplex **NA59** zwischen Viren des H3N2- und H1N1-Subtyps differenzieren kann, was bemerkenswert ist, weil die monovalente Referenzsubstanz (Sialyl-Lactose) gegen alle drei Virustypen die gleiche Inhibition zeigt. So wurde von Komplex **NA59** die Hämagglutination von X31-Viren (H3N2) mindestens 10-mal besser inhibiert als die von Pr8 (H1N1). Zwischen X31 und Panama, die beide zum humanpathogenen H3N2-Stamm gehören, wurde nicht unterschieden. Es stellt sich die Frage, wie sich die Serospezifität bei oligomerisierter Darstellung der bivalenten Binder verhält. Für diese Untersuchung wurden Cy3-markierte Komplexe verwendet. Der lineare Komplex **L6500-Cy3** inhibierte die Hämagglutination der X31-Viren (H3N2) bei einer Komplexkonzentration von 20 nM, gegenüber 80 nM, die benötigt wurden, um eine vollständige Inhibition bei Panama-Viren (H3N2) zu erzielen (Abbildung 30, Experimenteller Teil: Tabelle 20). Die Abwesenheit des versteifenden, unmodifizierten PNA-Oligomers **PNA1** verbesserte die Inhibition für Komplex **L6500-2-Cy3** ($K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA}) = 9 \text{ nM}$) gegenüber X31-Viren. Allerdings führt der Anstieg der Gerüstflexibilität auch dazu, dass **L6500-2-Cy3** breitbandwirksame Aktivität, auch gegen Pr8 (H1N1), zeigte. Für **L6500-Cy3** und **L6500-2-Cy3** demonstrieren diese Ergebnisse eine ausgeprägte Abhängigkeit des Inhibitions potentials und der Serospezifität von der Gerüstflexibilität dieser Komplexe. Dieses Verhalten wurde nicht von den verzweigten Komplexen (**B3000-Cy3** und **B3000-3-Cy3**) gezeigt, die beide eine dem Komplex **NA59** ähnliche Serospezifität aufwiesen (Abbildung 30).

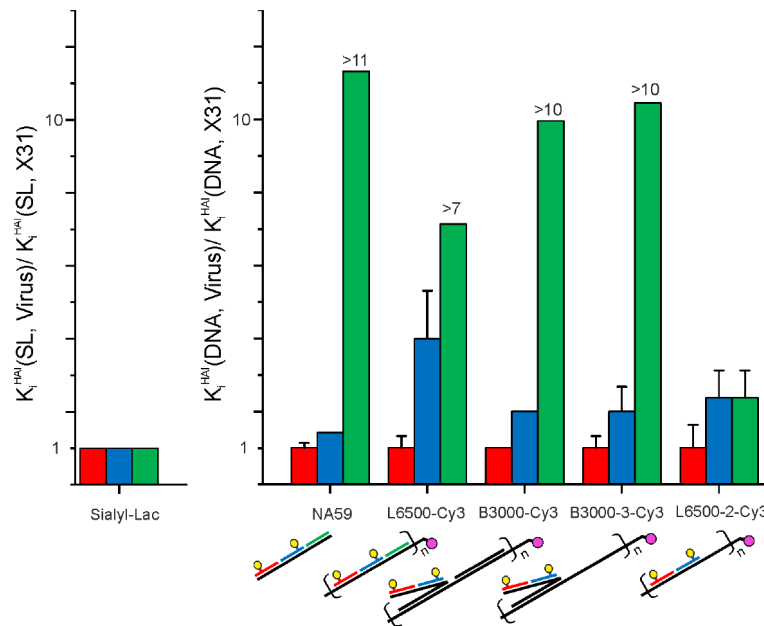


Abbildung 30: Inhibition der Hämagglutination von X31 (■), Panama (■, beide H3N2) und Pr8 (■, H1N1) durch lineare (L6500-Cy3, L6500-2-Cy3) und verzweigte (B3000-Cy3, B3000-2-Cy3) Cy3-markierte Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe, den bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplex NA59 und die monovalente Sialyl-Lactose (SL). Die Konzentration an DNA-Templat (für die Komplexe), beziehungsweise Trisaccharid (für SLN 17), die für eine vollständige Inhibition eines viralen Subtyps benötigte wurde, wurde ins Verhältnis mit dem jeweiligen K_i^{HAI} -Wert für den X31-Virus gesetzt. Ein $K_i^{HAI}(\text{DNA, Virus}) / K_i^{HAI}(\text{DNA, X31}) > x$ bedeutet, dass die virale Hämagglutination eines Subtyps mindestens x-mal schlechter verlaufen ist als die gegen den X31-Virus. Für Säulen ohne Fehlerbalken wurde die Inhibition der Hämagglutination wiederholt bei der identischen Konzentration erhalten.

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Wechselwirkung von linearen Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen und Influenza A-Viren (X31)

Um ein besseres Verständnis darüber zu erhalten, wie die multivalenten Komplexe Viren erkennen, wurden Untersuchungen mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt.^[36, 81, 138] Dabei lag der Fokus auf den linearen Anordnungen, da diese in den vorherigen Untersuchungen eine hohe Affinität und Serospezifität bewiesen. Das DNA-Templat RCA3, welches in einer RCA-Reaktion generiert wurde und Tandemwiederholungen der Länge von 39 nt aufweist, wurde als erstes untersucht. In der Analyse der erhaltenen Aufnahme werden filamentöse Morphologien sichtbar (Experimenteller Teil: Abbildung 66). Nicht untersucht wurde, ob die Filamente auch bei geringeren Konzentrationen an RCA-Produkt bestehen. Nach Hybridisierung der PNA-Trisaccharid-Konjugate können zwei Morphologien deutlich unterschieden werden (Abbildung 31A). Zum einen sind filamentöse, „Spaghetti“-artige Strukturen zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um verwobene lineare Formen handelt (orange Pfeile). Zum anderen können

aggregierte Strukturen differenziert werden, aus denen Einzelstränge ragen. Diese „Watteball“-ähnlichen Formen zeichnen sich durch eine erhöhte Elektronendichte aus. Zudem treten in einigen Aufnahmen auch konische Formen als zusätzliche morphologische Spezies auf (Experimenteller Teil: Abbildung 67). Ob alle drei Morphologien auch in Lösung auftreten, kann zum Zeitpunkt dieser Untersuchung nicht gesagt werden. Allerdings kann geschlussfolgert werden, dass die untersuchten Komplexe sehr wahrscheinlich nicht uniform vorliegen.

Daraufhin wurden die Komplexe in Anwesenheit der IAVen (X31) inkubiert und präpariert. Aus den erhaltenen Aufnahmen ist eine Interaktion der Viruspartikel mit den „Watteball“-ähnlichen und mit den linearen, filamentösen Strukturen sichtbar (Abbildung 31B, C). Eine Überbrückung benachbarter HA-Trimere durch die multivalenten Komplexe deutet sich dabei an. Um diese Frage genauer untersuchen zu können, ist eine exakte räumliche Positionierung der wechselwirkenden Partner notwendig. Da diese nicht in zweidimensionalen Kryo-TEM-Aufnahmen gewährleistet ist, wurde Kryo-Elektronentomographie durchgeführt. In dreidimensionalen Rekonstruktionen zeigte der „Watteball“-ähnliche Typ deutliche Bindung an den Virus (Abbildung 31D). Der filamentöse Typ ist wahrscheinlich zu labil für die tomographischen Serien mit wiederholter Strahlungsaussetzung und konnte deshalb nicht sichtbar gemacht werden. An dieser Stelle könnte die Verwendung kontrasterhöhender Markierungen, wie Goldnanopartikel, die Visualisierung der Anbindung vor allem der linearen Strukturen verbessern.

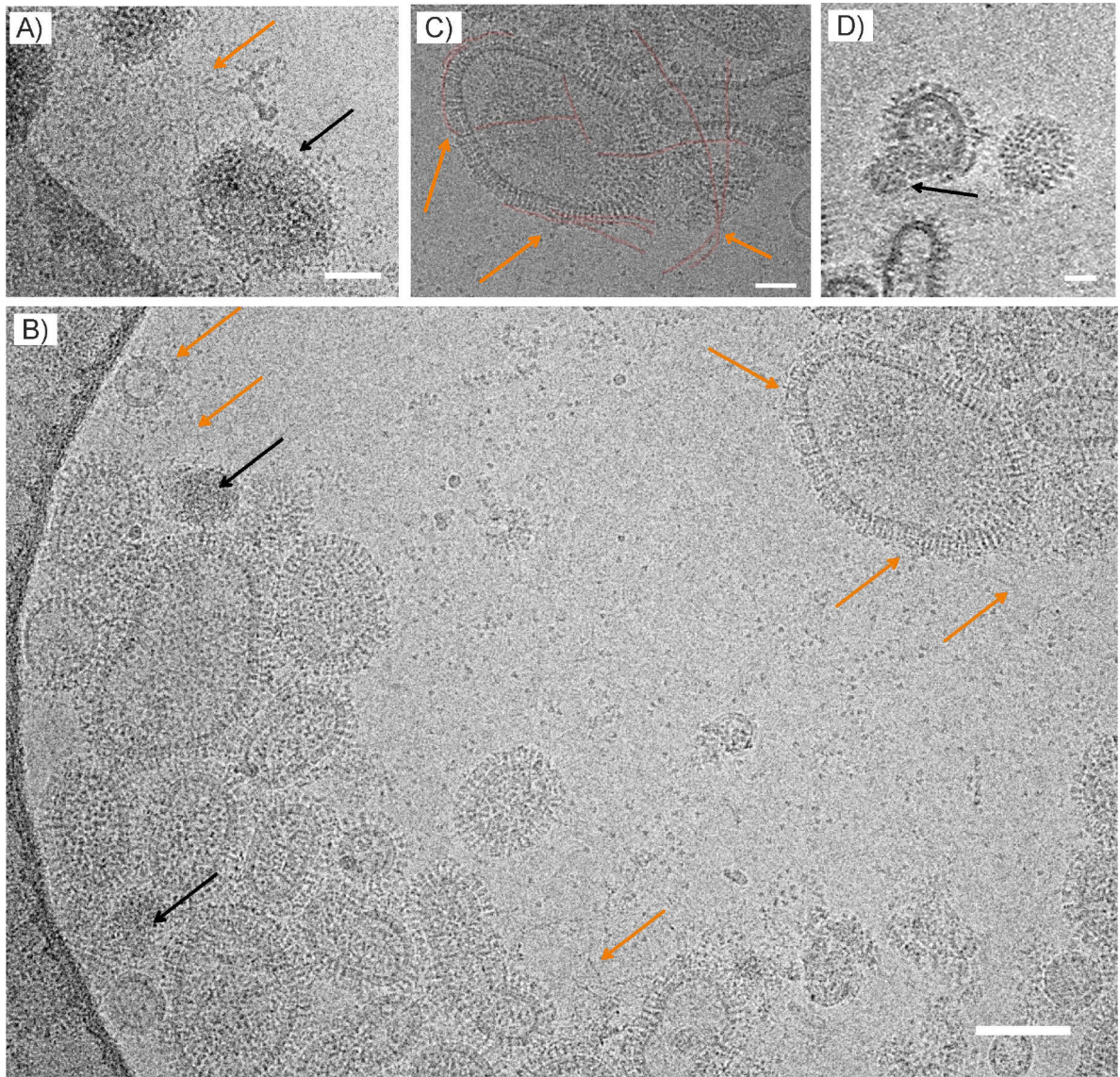


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Untersuchung von oligomerisierten PNA·DNA-Komplexen und deren Wechselwirkung mit X31-Viren. (A) Morphologie des Komplexes L6500-2-Cy3 in PBS-Puffer (pH 7.5) eingebettet in vitrifiziertem Eis (Endkonzentration RCA-Produkt: $\approx 17 \text{ ng}/\mu\text{L}$; Endkonzentration Trisaccharid: $110 \text{ pmol}/\mu\text{L}$). Die Pfeile zeigen auf Beispiele für filamentöse, „Spaghetti“-artige Strukturen (orange) und aggregierte Strukturen (schwarz). Maßstab: 50 nm. (B) Kryo-TEM-Aufnahme von Komplex L6500-2-Cy3 inkubiert mit IAV X31 in PBS-Puffer (Endkonzentration RCA-Produkt: $\approx 9 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Endkonzentration Trisaccharid: $\approx 55 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) für 30 Minuten bei Raumtemperatur und Einbettung in vitrifiziertem Eis. Maßstab: 100 nm. (C) Detailliertere Aufnahme von (B), in der die linearen Trisaccharid-PNA·DNA-Strukturen rot hervorgehoben sind. Maßstab: 50 nm. (D) Schnitt durch ein rekonstruiertes 3D-Volumen einer Kryo-Elektronentomographie-Serie des Komplexes L6500-2-Cy3 nach 30-minütiger Inkubation mit X31-Viren bei Raumtemperatur in PBS-Puffer (Endkonzentration RCA-Produkt: $\approx 9 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Endkonzentration Trisaccharid: $\approx 55 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) deutet auf eine direkte virale Anbindung des aggregierten Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexes L6500-2-Cy3 hin. Maßstab: 50 nm. Diese Aufnahmen wurden von Dr. Kai Ludwig (AG Böttcher, FU Berlin) angefertigt.^[143]

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Das Prinzip der Multivalenz ist in der Natur allgegenwärtig. Durch multiple Interaktionen von Liganden eines Bindungspartners mit Rezeptoren eines anderen Bindungspartners werden starke und selektive Wechselwirkungen ermöglicht. Influenza A-Viren nutzen dies, um mit ihrem Oberflächenprotein, dem Hämagglutinin (HA), an epitheliale Wirtszellen zu binden. Dieser initiale Schritt der viralen Replikation bietet einen interessanten Ansatzpunkt für multivalente Inhibitoren, wenn es gelingt, die Bedingungen für eine effiziente Wechselwirkung mit dem Virus zu entschlüsseln. Hierzu sollte in dieser Arbeit zunächst eine Charakterisierung des Hämagglutinin-Trimers auf viralen Partikeln durchgeführt werden. Dafür wurden zwei völlig unterschiedliche Systeme, basierend auf rigiden Peptidnukleinsäure (PNA)·DNA-Duplexen und flexiblen Polyethylenglykol-Gerüsten, gegenübergestellt. Diese Studie deckt erstmals einen Abstandsbereich zwischen zwei Liganden von 20-100 Å ab und bietet damit die Möglichkeit zu untersuchen, ob eine Bindungsverstärkung von der Interaktion des bivalenten Liganden mit zwei Bindungsstellen eines Hämagglutinin-Trimers herrührt oder durch Erkennung zweier Bindungsstellen über zwei benachbarte HA-Trimere herbeigeführt wird.

Zunächst wurde ein molekulares Lineal für das virale Hämagglutinin auf Basis von Peptidnukleinsäure (PNA)·DNA-Duplexen entwickelt (Abbildung 32A, B). Dabei kodierte ein DNA-Templat (39 nt) die Positionen für PNA-Oligomere (13 nt). Es wurden fünf PNA-Oligomere synthetisiert, die eine Sialyl-LacNAc-Einheit an verschiedenen Positionen innerhalb der PNA-Sequenz trugen. In einem modularen Ansatz konnten nun, unter Verwendung verschiedener DNA-Template, zwei Trisaccharid-Liganden in einem Abstand von 7 bis 31 Nukleotiden entlang des PNA·DNA-Duplexes angeordnet werden. Der Trisaccharid-Ligand, welcher dem natürlichen Liganden des HA auf der Oberfläche ihrer Wirtszellen entspricht, wurde in mehreren chemoenzymatischen Reaktionen aus einem modifizierten *N*-Acetylglucosamin synthetisiert und mit einem Maleimid-Linker versehen. Mercaptomethylierte PNA-Monomere wurden in die PNA-Sequenzen eingeführt und die Trisaccharide mittels einer 1,4-Addition an das Maleimid ligiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Gerüsttypen wurde die Thiol-Maleimid-Kupplung auch für die Synthese des PEG-verbrückten bivalenten Ligandensystems verwendet und dafür eine Thymidin-Einheit an die terminalen Enden von PEG-Diaminen angebracht (Abbildung 32C).

Es wurden Distanz-Affinitäts-Beziehungen für die Interaktion des trimeren HA mit den bivalenten Präsentationen des Sialyl-LacNAc ermittelt. Zur Messung von Dissoziationskonstanten wurde die

mikroskalige Thermophorese (MST) eingesetzt. Die Untersuchungen zeigten, dass bivalente PEG-Konjugate nicht in der Lage waren, eine bivalente Verstärkung der Wechselwirkungen mit der löslichen HA-Ektodomäne oder mit HA auf der viralen Oberfläche herbeizuführen. Berechnungen von Susanne Liese (AG Netz, FU Berlin) ergaben, dass PEG-basierte Gerüste bei Distanzen der Bindungsstellen von 52 Å generell ungeeignet sind, eine bivalente Bindungsverstärkung zu erzielen, wenn die monovalente Interaktion schwach ist ($K_D(\text{mono}) > 1 \text{ mM}$). Ursächlich hierfür ist die hohe Gerüstflexibilität des PEG-Gerüsts, das bei einem Abstand von 52 Å nicht in der Lage ist, effektive Konzentrationen von $> 1 \text{ mM}$ zu vermitteln.

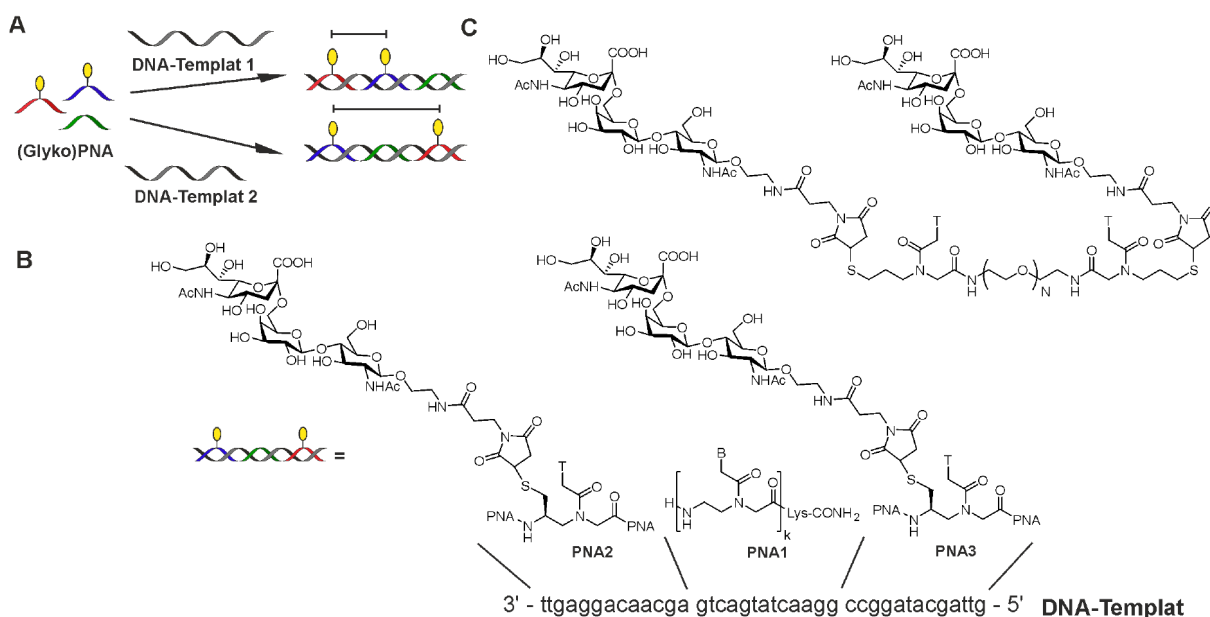


Abbildung 32: (A) Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein molekulares Lineal auf Basis von PNA·DNA-Duplexen verwendet. Durch Hybridisierung von modifizierten (rot, blau) und unmodifizierten (grün) PNA-Oligomeren auf DNA-Templaten wurden bivalente Duplexe erhalten, die die Glykoliganden in definierten Abständen entlang des Nukleinsäurerückgrats präsentierten. (B) Struktur eines bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexes und (C) eines bivalenten Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugats.

Die räumliche Rasterung mit PNA·DNA-Gerüsten ergab eine bimodale Distanz-Affinitäts-Beziehung, die sowohl bei löslichem HA als auch bei HA auf der viralen Oberfläche beobachtet werden konnte. Höchste Bindungsaffinitäten wurden erreicht, wenn die zwei Sialyl-LacNAc-Liganden in einem Abstand von 52 - 59 Å entlang des Nukleinsäurerückgrats angeordnet wurden. Dieses Affinitätsmaximum wurde einer simultanen Bindung an zwei kanonische Bindungsstellen eines HA-Trimers zugeordnet, was in Übereinstimmung mit dem auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur (1HGG.pdb) ermittelten Bereich von 45 - 52 Å steht, der notwendig ist, um die anomeren Kohlenstoffatome zweier Glykoliganden in zwei kanonischen Bindungsstellen über die Proteinoberfläche zu verbinden. Die Ergebnisse aus der DNA-programmierten räumlichen Rasterung und den Mo-

dellierungen auf Basis von Polymermodellen ermöglichten eine Untersuchung der Rolle der inter-trimerischen HA-HA-Überbrückung an der bivalenten Verstärkung. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wechselwirkungen innerhalb eines Trimers die bivalenten Wechselwirkungen der PNA-DNA-Komplexe mit den HA auf der viralen Oberfläche sehr genau beschreiben. Auch die Ergebnisse von Meyer *et al.* [86] zeigen das inhibitorische Potential multivalenter Glykokonjugate die für die passgenaue Erkennung des viralen Hämagglutinins konzipiert wurden, wobei der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz ohne strukturelle Vorkenntnisse der räumlichen Verteilung der Bindungsstellen auskommt. Moderate Verstärkungen die bei anderen Ansätzen erzielt wurden, deuten auf mangelnde strukturelle Voraussetzungen hin (~ 52 Å zwischen den Sialyl-LacNAc-Liganden) um eine Verbrückung der Bindungsstellen innerhalb eines Hämagglutinin-Trimers zu gewährleisten.[86, 144-145] Bei anderen Ansätzen erscheinen hingegen eine Verbrückung zweier Trimere auf der viralen Oberfläche[62, 88] oder unspezifische Rückgrat-Hämagglutinin-Wechselwirkungen als Ursache für die erzielte Bindungsverstärkung wahrscheinlicher.[102]

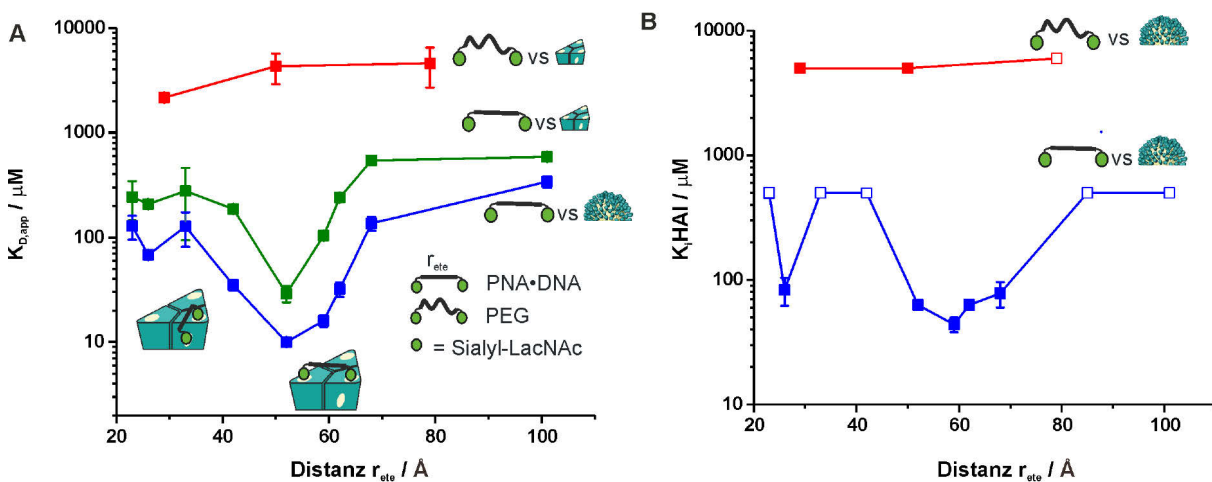


Abbildung 33: Räumliche Rasterung der Bindungsstellen von löslichen Hämagglutinin-Trimeren und X31-Viren mit bivalenten PNA-DNA-Komplexen (grün, blau) und PEG-Konjugaten (rot) in der mikroskaligen Thermophorese (A) und im Hämagglutinationstest (B). Die Messungen wurden von Daniel Lauster (AG Herrmann, HU Berlin) durchgeführt. Eine ausgeprägte bivalente Verstärkung (106-fach bezogen auf das Trisaccharid und 30-fach gegenüber einem monovalenten PNA-DNA-Komplex in Messungen mit löslichem HA-Trimer) wurde mit einem bivalenten PNA-DNA-Komplex erzielt bei dem die Zuckerliganden in einem Abstand von 52 Å voneinander getrennt wurden ($K_D = 29 \pm 5$ μM).

Zudem offenbarte die DNA-programmierte räumliche Rasterung ein zweites Affinitätsmaximum bei 26 Å zwischen den Liganden des PNA-DNA-Gerüsts. Dieses Optimum wurde in Messungen gegen das lösliche HA und die HA auf der viralen Oberfläche, bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Tests, beobachtet (Abbildung 33 A und B). Daher wird die Existenz einer sekundären Bindungsstelle angenommen, die bereits früher von Sauter *et al.* [98] beschrieben wurde. Auf Grundlage der experimentellen Ergebnisse und der Distanzabhängigkeit der effektiven Konzentration wurde

dafür eine Dissoziationskonstante $K_D(\text{sec}) = 200 \text{ mM}$ bestimmt, die zwei Größenordnungen größer ist als die für die kanonischen Bindungsstellen. Derartig schwache Interaktionen sind mit flexiblen Gerüsten nur schwer zu detektieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die optimierten bivalenten Binder auf Nukleinsäuregerüsten vielfach präsentiert werden. Hierzu wurde die Eignung von i) einer DNA-Drei-Wege-Kreuzung und ii) linearen und verzweigten DNA-Strukturen, basierend auf langen, repetitiven DNA-Templaten, untersucht. Dabei sollten mehrere Hämagglutinine auf der viralen Oberfläche verbrückt werden, um eine möglichst hohe Bindungsverstärkung zu erzielen. Die hergestellte DNA-Drei-Wege-Kreuzung, die aus drei bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Armen zusammengesetzt wurde, erwies sich als relativ instabil und zeigte keine Inhibition der viralen Hämagglutination. Wahrscheinlich behinderte der hohe Ordnungszustand dieser starren Architektur eine günstige Anbindung an die virale Oberfläche. Zur Inhibition von globulären Nanopartikeln wurde in dieser Studie erstmals die multivalente Präsentation von Glykoliganden auf langen DNA-Templaten demonstriert. Diese wurden mittels der *Rolling-Circle Amplification* (RCA)-Methode generiert und führten zu Sequenzen mit etwa 15 - 46 Wiederholungseinheiten (n), auf denen die zur Wechselwirkung mit einem HA-Trimer distanzoptimierten bivalenten Binder oligomerisiert werden sollten. Zum einen können Adapterstränge (AS) verwendet werden, auf denen vorgeformte bivalente Binder mit dem DNA-Templat zu verzweigten Anordnungen (BX000) hybridisieren. Zum anderen führt eine direkte Hybridisierung der PNA-Zucker-Konjugate auf dem DNA-Templat zu linearen Anordnungen (LXX00). Mit **B3000** und **L10900-2** gelang eine vollständige Inhibition der Virus-induzierten Hämagglutination bei einer Konzentration von 10^{-9} M des Templats, was einer 10^7 -fachen Verstärkung bezogen auf den monovalenten Zucker entspricht. Dabei konnte durch Einsatz des langen DNA-Templats eine 10^4 -fache Reduzierung der benötigten Zuckermenge erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass höchste Inhibition mit flexiblen Anordnungen, durch verzweigte oder lineare Hybridisierung der PNA-Oligomere mit ungepaarten Einzelstrangbereichen auf dem DNA-Templat, erzielt wurde. In einer Kryo-TEM-Analyse wurde deutlich, dass die untersuchten multivalenten Komplexe polymorphe Strukturen einnehmen. Bedingt durch eine Anpassung an die konvexe Virusoberfläche, sind die Komplexe wahrscheinlich in der Lage, mehrere benachbarte HA-Trimere zu überbrücken.

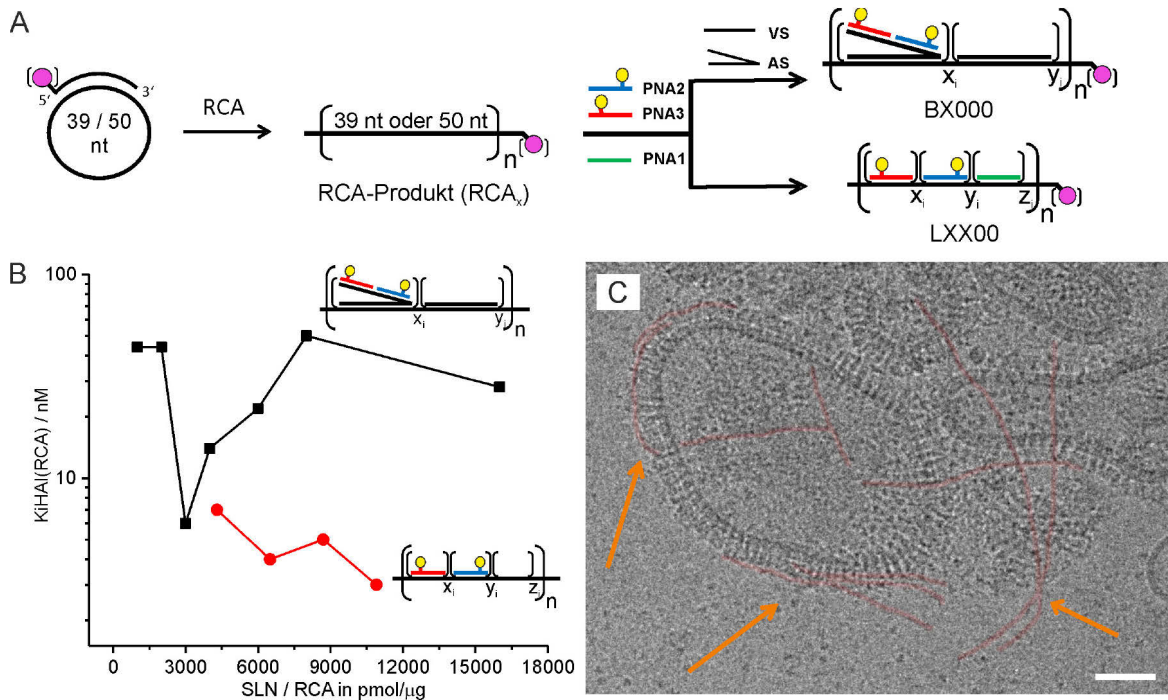


Abbildung 34: (A) Generierung langer repetitiver DNA-Einzelstränge (RCA_x) mittels *Rolling-Circle Amplification* (RCA) als Template für die verzweigte (BX000) und lineare (LXX00) Hybridisierung von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten. n = Anzahl der Tandem-Wiederholungseinheiten; $(x; y; z)=1$ oder 0, mit $i=1, 2, \dots, n$; (B) Inhibition von Influenza X31-induzierter Hämagglutination durch verzweigt (schwarz) und linear (rot) präsentierte Sialyl-LacNAc-Liganden. (C) Kryo-TEM-Aufnahme von multivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexen mit Influenza A-Viren (X31). Rot hervorgehobene Strukturen deuten eine direkte Wechselwirkung zwischen den linearen Strukturen der multivalenten Komplexe und den Hämagglutininen der viralen Oberfläche an.

In der Literatur wurden bereits multivalente Glykokluster beschrieben die beeindruckenden Verstärkungsfaktoren von bis zu fünf Größenordnungen im Vergleich zum monovalenten Zucker erzielen.^[77] Das Risiko, dass derartig potente Verbindungen auch an andere Sialinsäure-Rezeptoren im Organismus binden ist sehr hoch, weshalb deren Bindungsspezifität eine besondere Bedeutung zukommen sollte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Präzisionsgerüste zur Entwicklung subtypspezifischer viraler Inhibitoren verwendet werden können. So inhibierte ein optimierter bivalenter Binder die virale Hämagglutination des X31 (H3N2) mindestens 10-mal besser als die von Pr8 (H1N1), obwohl beide Viren von der monovalente Referenzsubstanz gleichermaßen erkannt wurden. *Baker et al.*^[85] berichten von einer Verbesserung der Stammspezifität bei Verwendung von 64 Sialinsäureresten die über ein dendritisches Polyamidoamin (PAMAM) präsentiert wurden. In der vorliegenden Dissertation wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Spezifität gegenüber viralen Stämmen durch die geeignete Präsentation von nur zwei Zuckern erzeugt werden kann.

Durch Oligomerisierung des bivalenten Binders auf langen DNA-Templaten konnte demonstriert werden, dass Rigidifizierung des DNA-Rückgrats hilft, unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern. Starre Anordnungen über lineare Hybridisierung diskriminierten Pr8 (H1N1) und unterschieden sogar zwischen X31 und Panamasträngen, die beide dem H3N2-Subtyp angehören. Flexibilisierung des DNA-Rückgrats führt hingegen zu Breitbandaktivität gegenüber allen drei untersuchten Viren. Zusammenfassend ermöglichte die multivalente Präsentation auf langen selbstassemblierenden DNA-Strukturen die Entwicklung hochpotenter und selektiver Inhibitoren für Influenza A-Viren und stellt darüber hinaus auch ein vielversprechendes Werkzeug zur multivalenten Erkennung von Proteinen auf globulären Systemen, wie anderen Viren oder Zellen, dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Konzept zur Charakterisierung von Hämagglutininen vorgestellt welches die Entwicklung hochpotenter Inhibitoren des Influenza-Virus ermöglichte. Folgende Meilensteine wurden dabei erreicht:

- i) Entwicklung einer robusten Synthesestrategie für die gewünschten Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugate
- ii) in einem modularen Ansatz wurden durch Kombination und Permutation diverser Konjugate auf DNA-Templaten bivalente Komplexe im Abstandsbereich von 7 bis 31 Nukleotiden (20-100 Å) hergestellt und charakterisiert
- iii) Abstandsrasterungen des löslichen viralen Hämagglutinins und des Hämagglutinins auf humanen Influenza-Partikeln wurden mittels eines Hämagglutinationstests und der mikroskopischen Thermophorese durchgeführt
- iv) Vergleich von zwei völlig unterschiedlichen Systemen, basierend auf rigiden Peptidnukleinsäure (PNA)·DNA-Duplexen und flexiblen Polyethylenglykol-Gerüsten
- v) Identifikation optimaler Bedingungen für bivalente Inhibitoren und Untersuchung des vorherrschenden Bindungsmechanismus
- vi) Lineare und verzweigte Oligomerisierung bivalenter Binder auf langen repetitiven DNA-Templaten, die mittels RCA-Reaktion generiert wurden
- vii) Identifikation hochpotenter Inhibitoren des humanen Influenza-Virus und Untersuchungen zur Bindungsspezifität

5.2 Ausblick

Um das volle Potential multivalenter Inhibitoren entfalten zu können, bedarf es Gerüst-Architekturen, die eine systematische Untersuchung wichtiger affinitätsbestimmender Parameter, wie Valenz, Abstand und Flexibilität, gestatten. Wie die vorliegende Arbeit demonstriert, erlaubt die sequenzinstruierte Selbstassemblierung von DNA-Strukturen eine sehr einfache Anpassung der DNA-Strukturen und stellt damit einen vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung spezifischer und hochaffiner Binder von Oberflächenproteinen auf Zellen und Viren zur Verfügung.

Nukleinsäurebasierte Systeme haben sich als molekulare Lineale zur Abstandsbestimmung von Bindungsstellen auf einzelnen Proteinen, aber auch bei komplexen Ansammlungen von vielen Proteinen auf Zellen oder Viren, etabliert und werden auch zukünftig zur Aufklärung multivalenter Wechselwirkungen beitragen. Hierfür wurde in dieser Arbeit eine generische Methode vorgestellt, wie mit Präzisionsgerüsten und mithilfe von Analysen der statistischen Mechanik potentielle sekundäre Bindungsstellen identifiziert und charakterisiert werden können. Weiterhin wurde für zukünftige Untersuchungen gezeigt, wie unterschiedliche Bindungsmodi in komplexen Rezeptorordnungen differenziert werden könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich sein sollte, spezifische Inhibitoren oder Detektionssysteme zu entwickeln, die in der Lage sind, zwischen verschiedenen viralen Subtypen zu unterscheiden. In einem weiteren Projekt in der Arbeitsgruppe Seitz wird aktuell untersucht wie durch die exakte Präsentation von Liganden zwischen den Lektinen Langerin und DC-SIGN unterschieden werden kann, obwohl diese denselben Mannose-Liganden erkennen.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, bieten lange einzelsträngige DNA-Template interessante Möglichkeiten für die multivalente Präsentation von Liganden. Weitere Verbesserungen sollten zum Beispiel durch mehr Kontrolle über die Längen der einzelsträngigen DNA-Template erzielt werden. So könnten zukünftige Ansätze nicht-repetitive und monodisperse Template, wie den 7249 nt langen Einzelstrang des M13mp18-Virus, in Betracht ziehen.

Ferner wäre es interessant, Anwendungsperspektiven von antiviralen PNA-DNA-Komplexen zu untersuchen und zum Beispiel deren Funktionalität in einem zellbasierten Infektionstest zu testen. Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass auch Aptamere, Peptide oder andere Kleinmoleküle auf PNA-DNA-Duplexen multivalent präsentiert werden können. Da diese zum Teil deutlich geringere monovalente Dissoziationskonstanten aufweisen, wären damit weitaus höhere Affinitäten für die multivalenten Komplexe vorstellbar. Auch eine heterovalente Präsentation in Kombination mit Neuraminidaseinhibitoren könnte die antiviralen Eigenschaften weiter erhöhen.

6. Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Materialien

6.1.1 Lösungsmittel und Reagenzien

Alle Reaktionen mit feuchtigkeit- oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Kommerziell verfügbare Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Kupplungsreagenzien, Aminosäurebausteine, PNA-Monomere und Syntheseharze wurden von *Carl Roth* (Karlsruhe), *ASM Research Chemicals* (Burgwedel), *Novabiochem* (Darmstadt), *Angene* (Nanjing), *Carbolution Chemicals* (Saarbrücken), *Iris Biotech* (Marktredwitz) und *Rapp Polymere* (Tübingen) bezogen. *Oxyrna Pure* wurde von *Luxembourg Biotechnologies* zur Verfügung gestellt. Für die Festphasensynthese wurde DMF der Qualitätsstufe „synthesis grade“ von *Biosolve* (Valkenswaard) und DMF der Qualitätsstufe „for synthesis“ von *VWR Chemicals* (Darmstadt) eingesetzt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von *Deutero* (Kastellaun) bezogen. Für HPLC-basierte Reinigungen und Analysen wurde Acetonitril des Reinheitsgrades „HPLC-grade“ von *VWR Chemicals* (Darmstadt) verwendet. Lösungsmittel wurden mit einer SPS 800 Anlage von *M. BRAUN* oder nach Standardverfahren getrocknet. CMP-Sialinsäure Synthetase aus *Neisseria meningitidis group B* (EC-Nummer: 2.7.7.43) und α 2,6-Sialyltransferase (EC-Nummer: 2.7.7.43) wurden von Sigma-Aldrich (Schnelldorf) bezogen. Alle Enzyme die in Zyklisierungs- und RCA-Reaktionen eingesetzt wurden, stammen von *Epicentre* oder *Thermo Scientific*. DNA-Oligonukleotide (HPLC- oder PAGE-gereinigt) wurden von *Biotez* (Berlin) oder *Biomers* (Ulm) erhalten. Polyethylenglykoldiamine wurden bei *Polypure* (Oslo), *Sigma Aldrich* (Schnelldorf) oder *Rapp Polymere* (Tübingen), Methoxypolyethylenglykolamine bei *ChemPep* (Wellington) und *Rapp Polymere* (Tübingen) bestellt. Alle anderen Reagenzien für Reaktionen in Lösung wurden von *Sigma Aldrich*, *Alfa Aesar* (Karlsruhe), *TCI* (Eschborn), *Merck* (Darmstadt), *VWR Chemicals* (Darmstadt), *AppliChem* (Darmstadt) und *Acros Organics* (Geel) bezogen.

Deionisiertes/ Millipore Wasser wurde durch Verwendung einer *Milli-Q Ultra Pure Water Purification* Anlage von *membraPure* (Henningsdorf) erhalten. (*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminoethyl)- β -*N*-acetyllactosaminid^[22] (**16**), (1-Thyminy)-essigsäure^[146], *N*-succinimidyl-3-maleimidopropionat^[147-148], *S*-trityl-3-mercaptopropansäure^[149] (**25**) und das mercaptomethylierte PNA-Monomer^[22] **19** wurde nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert.

6.1.2 Chromatographische Methoden

Analytische UPLC™-MS: Für die analytische Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wurde ein *ACQUITY UPLC* System mit Quadrupol-Analysator von *Waters* (Milford) mit Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) wobei hauptsächlich die Wellenlängen $\lambda = 210$ und $\lambda = 260$ nm betrachtet wurden. Für *ACQUITY UPLC BEH130 C18-Säulen* (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) wurde ein Lösungsmittelgemisch aus A (98.9 % H₂O, 1% MeCN, 0.1 % TFA) und B (98.9 % MeCN, 1% H₂O, 0.1% TFA) als mobile Phase genutzt. Die Analysen erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 mL/min bei 50°C.

Semi-präparative HPLC-Reinigungen erfolgten auf einer Anlage von *Agilent* (Santa Clara) der 1100 Serie. Für *Polaris C18-A-Säulen* (250 x 10.0 mm) von *Varian* (Palo Alto), wurde ein Lösungsmittelgemisch aus A (98.9% H₂O, 1% MeCN, 0.1% TFA) und B (98.9% MeCN, 1% H₂O, 0.1% TFA) als mobile Phase genutzt. Die Trennungen erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 6 mL/min.

Präparative HPLC-Reinigungen erfolgten auf einer Anlage von *Agilent* (Santa Clara) der 1100 Serie: Für *Nucleodur C18 Gravity-Säulen* (250 mm x 21 mm, 5 μ m) von *Macherey-Nagel* (Düren) wurde ein Lösungsmittelgemisch aus A (98.9% H₂O, 1% MeCN, 0.1% TFA) und B (98.9% MeCN, 1% H₂O, 0.1% TFA) als mobile Phase genutzt. Die Trennungen erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 15 mL/min.

Säulenchromatographie: Für die manuelle präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.063-0.200 mm) von *Acros Organics* (Geel) oder *Merck* (Darmstadt) verwendet. Als mobile Phase dienten verschiedene Lösungsmittelgemische von technischer Reinheit. Die Trennung erfolgte bei einem Druck von 0.5 - 1 bar.

Dünnschichtchromatographie: Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ Aluminiumplatten von *Merck* (Darmstadt) der Schichtdicke 0.2 mm verwendet. Die Visualisierung erfolgte entweder durch Fluoreszenzlöschung (Wellenlänge $\lambda = 254$ nm) oder durch Anfärben mit folgenden Tauchreagenzien: Kaliumpermanganat-Lösung (5 g Kaliumpermanganat und 33 g Kaliumcarbonat in 500 mL einer wässrigen 0.02 % Natriumhydroxid-Lösung), Ninhydrin-Lösung (0.2 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol/Essigsäure (97/3, v/v)) oder ethanolische Schwefelsäure (5 mL konzentrierte Schwefelsäure in 95 mL Ethanol).

6.1.3 Massenspektrometrie

MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeit)-Analysen erfolgten an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* (Kyoto) unter Verwendung einer CHCA-Matrix (10 mg α -Cyano-4-hydroxymizinsäure in 1 mL H₂O/MeCN/TFA (1/1/0.001, v/v/v), Sinapinsäure-Matrix (10 mg Sinapinsäure in 1 mL H₂O/MeCN/TFA (1/1/0.1, v/v/v) und DCTB-Matrix (10 mg trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril in 1 mL H₂O/MeCN (1/1, v/v)).

Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) wurde an einem *LTQ FT* (ESI+)-Spektrometer von *Thermo Finnigan* (Somerset) oder einem *Qstar XL*-Spektrometer von *Applied Biosystems* (Foster City) durchgeführt.

6.1.4 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden an einem *Avance II* 500 MHz Spektrometer von *Bruker* (Billerica) gemessen. Die Signale der deuterierten Lösungsmittel wurden als Referenzsignale verwendet.^[150] Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm und die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben. Zur Bezeichnung der Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplet, m = Multiplett und b = breites Signal.

6.1.5 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit dem *ND-1000* Spektrometer von *NanoDrop Technologies* (Wilmington) aufgenommen. Molare Extinktionskoeffizienten für DNA-Oligomere bei 260 nm wurden mit dem *OligoAnalyzer* von *Integrated DNA Technologies* bestimmt (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Für PNA-Oligomere wurden die Extinktionskoeffizienten der einzelnen PNA-Monomere bei 260 nm aufsummiert: a: 13700 L·mol⁻¹·cm⁻¹; c: 6600 L·mol⁻¹·cm⁻¹; g: 11700 L·mol⁻¹·cm⁻¹; t: 8800 L·mol⁻¹·cm⁻¹. Die Absorption der Glykoliganden wurde vernachlässigt.

6.1.6 Fluoreszenzmessungen am Plattenlesegerät

Fluoreszenzintensitäten wurden am *Victor X5 Multimode* Plattenlesegerät von *Perkin Elmer* (Waltham) bestimmt. Dafür wurden Multititerplatten mit 384 Kavitäten verwendet. Es wurden Filter mit $\lambda_{\text{ex}} = 531$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm gewählt. Die Messzeit pro Kavität betrug 1 Sekunde.

6.1.7 Denaturierungsexperimente

Zur Bestimmung von Schmelztemperaturen wurden thermische Denaturierungsexperimente an einem *Cary Bio 100* UV-Vis Spektrometer durchgeführt. Hierfür wurden 1 mL UV/Vis-Küvetten des Typs *114-QS* der Firma *Hellma* verwendet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Messung unter folgenden Bedingungen: 0.5 μ M Komplex, 10 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0. Während eines Temperaturprogramms (3 Zyklen von 20-90°C in 0.5°C/min) wurde die Absorption in der Heizphase bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm aufgenommen. Die Schmelzkurven aus der gegen die Temperatur aufgetragenen Absorption wurden in dem Programm *Origin 9.1* abgeleitet. Das Maximum dieser Ableitung entspricht dem Wendepunkt der Schmelzkurve und somit der Schmelztemperatur.

6.1.8 Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden in einer Apparatur des Typs *Mini-Protean Tetra Cell* von *Bio-Rad* durchgeführt und zur Stromversorgung kam ein Gerät des Typs *PS 9009 TX* von *Apelex* zum Einsatz. Nach dem elektrophoretischen Lauf wurde das Gel für 10-15 Minuten in 20 mL des Laufpuffers mit 2 μ L *SybrGold* (10.000x in Dimethylsulfoxid (DMSO)) gelegt und anschließend die fluoreszierenden Banden ($\lambda_{\text{Ex}} = 495$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 535$ nm) an einer *Image Station 4000MM Pro* von *Kodak* oder dem *ChemiDoc MP Imaging System* von *Bio-Rad Laboratories* (Modell *Universal Hood III*, *Image Lab Software* Version 5.2.1) ausgelesen.

Denaturierende Gele zur Untersuchung der DNA-Zyklisierungen:

10x TBE-Puffer:	121.1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 61.8 g Borsäure und 7.4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)·2Na in Wasser lösen und auf 1 L auffüllen
Ladepuffer (1-2x):	9.5 mL Formamid, 2.5 mg Bromphenolblau, 100 μ L EDTA (0.5 M in Wasser, pH 8.0), 400 μ L H_2O
Trennmedium:	1 mL 10x TBE, 5 mL Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, v/v, <i>Rotiphorese</i> ® Gel 40), 1 mL Wasser, 4.2 g Harnstoff (20% Gel)

Für die Herstellung des Trenngels wurden alle Bestandteile des Trennmediums vereint und geschüttelt. Nach Zugabe von 10 μ L *N, N, N', N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 100 μ L Ammoniumpersulfat-Lösung (10% in Wasser, m/m), bezogen auf 10 mL Gel, wurde die Lösung kurz geschüttelt und vorsichtig in die Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach etwa

30 Minuten war das Gel wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und vollständig polymerisiert. Das Gel wurde in die Gelelektrophoresapparatur eingespannt. Als Elektrolyt kam 1x TBE-Puffer zum Einsatz. Die Proben wurden mit dem Ladepuffer (ein- bis zweifaches Volumen der Probe) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde eine Spannung von 60-100 V angelegt und der Durchlauf beendet sofern der Farbstoff etwa zwei Drittel des Gels passiert hatte.

Native Gele für DNA-Drei-Wege-Kreuzungen:

5x TB-Puffer: 53.7 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 27.5 g Borsäure, 43.8 g Natriumchlorid und 5.0 g Magnesiumchlorid in Wasser lösen und auf 1 L auffüllen

Ladepuffer: Glycerol und 1x TB (1/2, v/v)

Tabelle 6: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.

	4%	8%	10%	20%
Rotiphorese® Gel 40 /mL	1	2	2.5	5
5x TB-Puffer /mL	2	2	2	2
Wasser /mL	7	6	5.5	3

Für die Herstellung des Trenngels wurden alle Bestandteile des Trennmediums vereint und geschüttelt. Nach Zugabe von 10 µL TEMED und 100 µL Ammoniumpersulfat-Lösung (10% in Wasser, m/m), bezogen auf 10 mL Gel, wurde die Lösung kurz geschüttelt und vorsichtig in die Gelkammer gegossen. Nach Beendigung der Polymerisation wurden alle Bestandteile des Sammelgels vereint und geschüttelt. Nach Zugabe von 10 µL TEMED und 100 µL Ammoniumpersulfat-Lösung (10% in Wasser, m/m), bezogen auf 10 mL Gel, wurde die Lösung kurz geschüttelt und vorsichtig in die Gelkammer über das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach etwa 30 Minuten war das Gel wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und konnte anschließend in die Gelelektrophoresapparatur eingespannt werden. Als Elektrolyt kam 1x TB-Puffer zum Einsatz. Die Proben (≈ 20 pmol pro DNA-Strang, 4 µL) wurden mit dem Ladepuffer (1 µL) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde für vier Stunden und bei 5°C eine Spannung von 20 V angelegt.

Agarose-Gelelektrophoresen wurden in einer Apparatur des Typs *Sub-Cell GT Mini* durchgeführt und zur Stromversorgung kam ein Gerät des Typs *PowerPac™ HC*, beides von *Bio-Rad*, zum Einsatz. Die fluoreszierenden Banden wurden an dem *ChemiDoc MP Imaging System* von *Bio-Rad Laboratories* (Modell *Universal Hood III*, *Image Lab Software* Version 5.2.1) ausgelesen. Als Referenz wurde eine DNA-Leiter (erweiterte 1000 Basenpaar von *New England Biolabs*) verwendet.

Experimenteller Teil

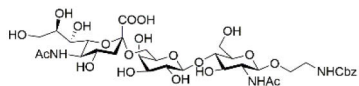
Laufpuffer: 1x TAE (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure)-Puffer

Trennmedium: 0.6%-Agarose Gel (150 mg Agarose in 30 mL 1x TAE)

Zur Herstellung des Trennmediums wurde die Agarose im TAE-Puffer suspendiert und kurz in einer Mikrowelle erhitzt, sodass sich die Agarose vollständig löste. Nach wenigen Minuten wurden 0.5 µL *SybrGold* hinzugefügt, das Gel in eine Gelkammer zur Polymerisation transferiert und ein Kamm hinzugefügt. Nach Abkühlen des Gels wurde die Apparatur mit 1x TAE-Puffer befüllt und die Proben in die Geltaschen pipettiert (5 µL Probe + 1 µL 6x Agarose-Ladepuffer). Die Laufzeit des Gels betrug etwa 90 Minuten bei Verwendung einer Spannung 50–100 V.

6.2 Synthesevorschriften

6.2.1 Synthese von Maleimido-Sialyl-LacNAc 18

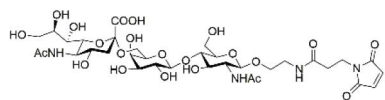


N-Cbz-aminoethyl-Sialyl-LacNAc 17: N-Cbz-aminoethyl-Lac-

NAc^[22] **16** (83 μ L, 8.3 μ mol, 0.2 M in Wasser), Cytidin-5'-triphosphorsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (83 μ L, 16.6 μ mol, 0.2 M in Wasser) und Sialinsäure (83 μ L, 16.6 μ mol, 0.2 M in Wasser) wurden im Puffer (2550 μ L, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES (0.1 M), MgCl₂ (20 mM), pH 7.5) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einer Natriumhydroxid-Lösung (2 M) auf 7.5 eingestellt. Eine Lösung von CMP-Sialinsäure Synthetase aus *Neisseria meningitidis* (0.55 U, EC-Nummer: 2.7.7.43) in Wasser (55 μ L) wurde hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Lösung der α -2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium damsela* (0.46 U, EC-Nummer: 2.7.7.43) in Wasser (18.4 μ L) dazugegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-UV-MS-Analyse untersucht (3-30 % B in 4 min). Bei vollständigem Reaktionsumsatz wurde das Rohprodukt durch Umkehrphasenchromatographie mittels Sep-Pak® C18-Säule gereinigt und direkt im nächsten Reaktionsschritt verwendet. Bei unvollständigem Umsatz des Disaccharids **16** wurden erneut CTP, Neu5Ac und CTP-Sialinsäure-Synthetase zugesetzt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand mittels semi-präparativer HPLC (3-30% B in 30 min) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktionen wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine Sep-Pak® C18-Kartusche von Waters (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Nachdem die Kartusche mit Wasser (3 mL) gespült wurde, erfolgte die Elution des Produkts mit Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (1:1:4·10⁻⁶, v/v/v, 6 mL). Nach Lyophilisierung konnte ein farbloser Schaum erhalten werden (5.2 mg, 74%).

t_R (UPLC) = 2.65 min (3-30 % B in 4 min); ESI-MS: m/z = 852.4 (für C₃₅H₅₄N₃O₂₁⁺ [M+H]⁺, berechnet: 852.3); R_f = 0.81 (Dichlormethan/Methanol/Wasser 6:4:1, v/v/v); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1.74 (t, 1H; ²J = 12.5 Hz, 3''-CH_{2ax}), 2.02 (s, 3H; CH₃²-NHAc), 2.06 (s, 3H; CH₃^{5''}-NHAc), 2.70 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H; 3''-CH_{2eq}), 3.31 – 3.40 (m, 2H; CH₂-NHCbz), 3.55 – 4.04 (m, 21H; CH₂-CH₂-NHCbz, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 5-CH, 6-CH₂, 2'-CH, 3'-CH, 4'-CH, 5'-CH, 6'-CH₂, 4''-CH, 5''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 9''-CH₂), 4.46 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H; 1'-CH), 4.57 (d, 1H; ³J = 6.7 Hz, 1-CH), 5.13 – 5.18 (m, 2H; CH₂-Ph), 7.40 – 7.54 (m, 5H; Ph-H₅); ¹³C-/APT NMR (126 MHz, D₂O): δ = 22.0, 22.2 (2xCH₃), 40.1 (3''-CH₂), 40.4 (CH₂-NHCbz), 51.9, 54.8, 60.4, 62.7, 63.4, 66.9, 68.2, 68.40, 68.44, 68.7, 70.8, 71.7, 72.4, 72.5, 72.6, 73.7, 74.5, 80.7 (5''-CH, 2-CH, 6-CH₂, 6'-CH₂, 9''-CH₂, CH₂-Ph, 4'-CH, CH₂-CH₂-NHCbz, 2'-CH, 5-CH, 3'-CH, 3-CH, 4-CH, 5'-CH, 4''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH), 100.18 (2''-C_q), 101.04 (1-CH), 103.49 (1'-CH), 127.82, 128.43, 128.82 (2 o-CH, 2 m-CH, p-CH), 136.47 (C_q^{Ph}), 158.36

$((C_q=O)^{Cbz})$, 173.54, 174.62, 175.0 ($1''-C_q$, 2 C_q^{Ac}); HRMS (ESI-): $m/z = 850.3094$ ($C_{35}H_{52}N_3O_{21}^-$ (M-H) $^-$, berechnet: 850.3099).



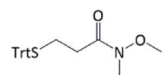
Maleimido-Sialyl-LacNAc 18: Eine Suspension aus *N*-Cbz-aminoethyl-Sialyl-LacNAc **17** (14 mg, 16 μ mol) und Pd auf Aktiv-

kohle (52 mg, 10%) in Methanol (30 mL) wurde in einer Wasserstoff-Atmosphäre für 30 Minuten gerührt. Die Suspension wurde durch einen Spritzenfilter (45 μ m) filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (3 mL, 0.1 M, pH 6.5) gelöst und *N*-Succinimidyl-3-maleimidopropionat^[124] (16 μ mol, 0.1 M in Dioxan) hinzugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS (0-20% B in 4 min) verfolgt und weiteres *N*-Succinimidyl-3-maleimidopropionat (jeweils 0.5 μ mol) hinzugegeben bis die Masse des deblockierten Amins nicht mehr detektiert werden konnte. Das Dioxan wurde im Vakuum entfernt, die verbliebene Suspension zentrifugiert und der Überstand mittels semi-präparativer HPLC (0-20% B in 30 min) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktionen wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine Sep-Pak® C18-Kartusche (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Nachdem die Kartusche mit Wasser (3 mL) gespült wurde, erfolgte die Elution des Produkts mit Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (1:1:4·10⁻⁶, v/v/v, 6 mL). Nach Lyophilisierung konnte ein farbloser Schaum erhalten werden (6.42 mg, 45%).

UPLC: $t_R = 1.51$ min (0-20% B in 4 min); ESI-MS: $m/z = 869.4$ (für $C_{34}H_{53}N_4O_{22}^+ [M+H]^+$ berechnet: 869.3); $R_f = 0.57$ (Isopropanol/ Ammoniumacetat (0.1 M in Wasser) 2:1, v/v); 1H -NMR (500 MHz, D₂O, presat): $\delta = 1.78$ (t, 1H, $^2J = 12.3$ Hz, $^3J = 12.0$ Hz, $3''-CH_{2ax}$), 2.08 (s, 3H, CH_3^{2-NHAc}), 2.10 (s, 3H, $CH_3^{5''-NHAc}$), 2.56 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, $C_q-CH_2-CH_2-N$), 2.72 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, $3''-CH_{2eq}$), 3.32 - 3.41 (m, 2H, CH_2-NH), 3.56 - 4.09 (m, 23H, CH_2-CH_2-NH , $C_q-CH_2-CH_2-N$, 2-CH, 3-CH, 4-CH, 5-CH, 6-CH₂, 2'-CH, 3'-CH, 4'-CH, 5'-CH, 6'-CH₂, 4''-CH, 5''-CH, 6''-CH, 7''-CH, 8''-CH, 9''-CH₂), 4.50 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, 1'-CH), 4.59 - 4.62 (m, 1H, 1-CH), 6.92 (s, 2H, 2x C_q-CH); HRMS (ESI-): $m/z = 867.3001$ ($C_{34}H_{51}N_4O_{22}^-$ (M-H) $^-$, berechnet: 867.3000).

6.2.2 Synthese von Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugaten

6.2.2.1 Synthese von *S*-Tritylthiopropyl-*N*-[(1-thyminyl)-acetyl]-glycin (29)

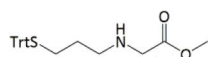


S-Tritylthiopropionsäure-Weinrebamid (26): In einer Argon-Schutzgasatmosphäre wurde eine Lösung von 3-(Tritylthio)propionsäure^[149] (**25**) (9.04 g,

25.82 mmol) und *N*-Methylmorpholin (6.3 mL, 57.30 mmol) in trockenem Dichlormethan

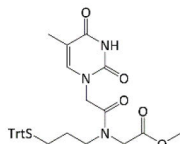
(400 mL) auf -10°C gekühlt und Isobutylchlorformiat (3.7 mL, 28.53 mmol) innerhalb von 5 Minuten hinzugegeben. Nachdem für 15 Minuten bei -10°C gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (2.5 g, 25.63 mmol). Nachdem 13 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Lösung mit einer Kaliumhydrogensulfat-Lösung (0.2 M in Wasser, 180 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3x170 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat/ Cyclohexan 1:1, v/v) konnte ein farbloser Feststoff erhalten werden (9.18 g, 91%).

$R_f = 0.69$ (Ethylacetat/ Cyclohexan 1:1, v/v); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.43 - 7.40$ (m, 6H, $6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}\text{-CH}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{q}}$), $7.28 - 7.24$ (m, 6H, $6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}\text{-CH}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{q}}$), $7.20 - 7.17$ (m, 3H, $3 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 3.54 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2.49 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.36 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 144.9$ ($3 \times \text{C}_{\text{q,ar}}$), 129.8 ($6 \times \text{CH}_{\text{ar}}\text{-CH}_{\text{ar}}\text{-C}_{\text{q,ar}}$), 128.0 ($6 \times \text{CH}_{\text{ar}}\text{-CH}_{\text{ar}}\text{-C}_{\text{q,ar}}$), 126.7 ($3 \times \text{CH}_{\text{ar}}$), 66.9 ($\text{C}_{\text{q,Trt}}$), 61.3 ($\text{CH}_3\text{-O}$), 32.3 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 31.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 26.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$). HRMS (ESI+): $m/z = 414.1499$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{O}_2\text{NNaS}^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, berechnet: 414.1498).



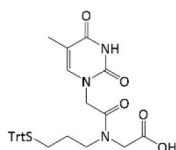
S-Tritylthiopropyl-aminoglycinmethylester (27): In einer Argon-Schutzgasatmosphäre wurde eine Lösung von *S*-Tritylthiopropionsäure-Weinrebamid (**26**) (8.47 g, 21.6 mmol) auf -72°C gekühlt, Lithiumaluminiumhydrid (12.4 mL, 29.22 mmol, 3.5 M in Tetrahydrofuran/ Toluol, 3:1, v/v) innerhalb von 10 Minuten zugetropft und 1 Stunde bei -72°C gerührt. Anschließend wurde vorsichtig eine Kaliumhydrogensulfat-Lösung (0.2 M in Wasser, 100 mL) hinzugegeben und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (2x170 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Salzsäure (1 M, 50 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und 5.47 g des Rohprodukts erhalten. Ein Teil des Rohprodukts (2.72 g) wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit Glycinmethylester-Hydrochlorid (3.18 g, 25.32 mmol) in trockenem Methanol/Tetrahydrofuran (80 mL, 1:3, v/v) suspendiert und Natriumcyanoborhydrid (0.51 g, mmol, 8.11 mmol) bei 5°C hinzugegeben. Nachdem 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Suspension unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand in Ethylacetat (400 mL) gelöst. Anschließend wurde mit Wasser (50 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen, die wässrigen Phasen mit Ethylacetat (je 75 mL) reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Ethylacetat/Cyclohexan 1:2-1:1, v/v) gereinigt wurde, konnte ein farbloses Öl erhalten werden (1.38 g, 32%, 2 Stufen).

$R_f = 0.31$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, v/v); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.35 - 7.32$ (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_q$), 7.22 – 7.18 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_q$), 7.15 – 7.11 (m, 3H, CH_{Ar}), 3.63 (s, 3H, CH_3), 3.25 (s, 2H, $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$), 2.47 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}$), 2.13 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2-S), 2.00 (b, 1H, NH), 1.51 – 1.45 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.9$ ($1 \times \text{C}_q=\text{O}$), 145.1 ($3 \times \text{C}_{q,\text{ar}}$), 129.8 ($6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}-\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_{q,\text{ar}}$), 128.0 ($6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}-\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_{q,\text{ar}}$), 126.8 ($3 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 66.8 ($\text{C}_{q,\text{Trt}}$), 52.0 (CH_3), 50.6 ($\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$), 48.6 (CH_2-S), 29.8 (CH_2-N), 29.1 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$). HRMS (ESI+): $m/z = 405.1835$ ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_2\text{S}^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, berechnet: 405.1835).



S-Tritylthiopropyl-N-[(1-thyminy)-acetyl]-glycinmethylester (28): In einer Argon-Schutzgasatmosphäre wurde (1-Thyminy)-essigsäure^[146] (850 mg, 4.64 mmol) in Acetonitril/*N,N*-Dimethylformamid (10 mL, 1:1, v/v) suspendiert und bei -10°C *N*-Methylmorpholin (3.4 mL, 30.94 mmol) und Pivaloylchlorid (0.8 mL, 6.50 mmol) hinzugefügt. Nachdem 20 Minuten bei -10°C gerührt wurde, wurde eine Lösung von *S*-Tritylthiopropyl-aminoglycinmethylester (27) in *N,N*-Dimethylformamid (10 mL) innerhalb von 5 Minuten hinzuge tropft und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zu Ethylacetat (200 mL) gegeben und mit Salzsäure (0.1 M, 3x100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 97:3, v/v) gereinigt und ein farbloses Öl (829 mg, 49%) erhalten.

$R_f = 0.37$ (Dichlormethan/Methanol, 96:4, v/v); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (2 Rotamere) = 8.73 (b, 1H, NH), 7.37 – 7.29 (m, 6H, $6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_q$), 7.26 – 7.19 (m, 6H, $6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}-\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_q$), 7.17 – 7.10 (m, 3H, $3 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 6.91 (s, 0.3H, $\text{CH}_{\text{ar,Thymin}}$), 6.84 (0.7H, $\text{CH}_{\text{ar,Thymin}}$), 4.40 (s, 1.4H, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}/\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 4.27 (s, 0.6H, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}/\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 3.96 (s, 0.6H, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}/\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 3.84 (s, 1.4H, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}/\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 3.71 (s, 0.9H, CH_3-O), 3.63 (s, 2.1H, CH_3-O), 3.22 – 3.15 (m, 2H, CH_2-N), 2.19 (t, 1.4H, CH_2-S), 2.08 (t, 0.6H, CH_2-S), 1.83 (s, 1H, $\text{CH}_3,\text{Thymin}$), 1.82 (s, 2H, $\text{CH}_3,\text{Thymin}$), 1.59 – 1.50 (m, 1.3H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$), 1.48 – 1.39 (m, 0.7H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ (2 Rotamere) = 169.6, 169.2, 167.1, 166.9, 144.8, 144.6 ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}$, $\text{C}(\text{O})-\text{NH}_{\text{Thymin}}$), 141.1, 141.0 ($\text{CH}_{\text{ar,Thymin}}$), 129.7, 129.6 ($6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}-\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_{q,\text{ar}}$), 128.1, 128.0 ($6 \times \text{CH}_{\text{Ar}}-\text{CH}_{\text{Ar}}-\text{C}_{q,\text{ar}}$), 127.0, 126.8 ($3 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 110.8, 110.7 ($1 \times \text{C}(\text{O})-\text{NH}_{\text{Thymin}}$), 67.2, 66.8 ($\text{C}_{q,\text{Trt}}$), 53.0, 52.5 ($1 \times \text{CH}_3-\text{O}$), 49.5 ($\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}/\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 48.1, 48.0, 47.7, 47.6 ($1 \times \text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}/1 \times \text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$, CH_2-N), 29.2, 28.8 (CH_2-S), 27.6, 26.5 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$), 12.5 ($\text{CH}_3,\text{Thymin}$). ESI-MS: $m/z = 594.4$ ($\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{S}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, berechnet: 594.7).



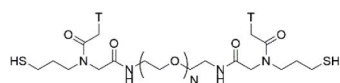
S-Tritylthiopropyl-N-[(1-thyminy)-acetyl]-glycin (29): Zu einer Lösung von *S*-Tritylthiopropyl-N-[(1-thyminy)-acetyl]-glycinmethylester (28) (945 mg, 1.65 mmol) in Tetrahydrofuran (17 mL) wurde bei 0°C eine Lithiumhydroxid-Lösung (6.57 mL, 3.30 mmol, 0.5 M in Wasser) gegeben. Nachdem für 2 Stunden gerührt wurde, wurde

die Lösung mit Ameisensäure (25% in Wasser) auf pH 3 angesäuert. Die Lösung wurde mit Ethylacetat (3x50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (15 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Ethylacetat reextrahiert (25 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol/Ameisensäure, 95:5:0.5, v/v/v) gereinigt und ein farbloser Feststoff (624 mg, 70%) erhalten.

$R_f = 0.32$ (Dichlormethan/Methanol/Ameisensäure, 95:5:0.5, v/v/v); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (2 Rotamere) = 11.29 (s, 0.6H, COOH) 11.28 (s, 0.4H, COOH), 7.36 – 7.30 (m, 12.6H, CH_{ar} , $\text{CH}_{\text{ar,Thy,a}}$), 7.27-7.22 (m, 3.4H, CH_{ar} , $\text{CH}_{\text{ar,Thy,b}}$), 4.52 (s, 1.2H, $\text{CH}_{2\text{a-COOH/N-C(O)CH}_{2\text{a}}$), 4.41 (s, 0.8H, $\text{CH}_{2\text{b-COOH/N-C(O)CH}_{2\text{b}}$), 4.09 (s, 0.8H, $\text{CH}_{2\text{b-COOH/N-C(O)CH}_{2\text{b}}$), 3.81 (s, $\approx 1.2\text{H}$, $\text{CH}_{2\text{b-COOH/N-C(O)CH}_{2\text{b}}$), 3.20 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1.2H, N- $\text{CH}_{2\text{a-CH}_2}$), 3.15 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 0.8H, N- $\text{CH}_{2\text{b-CH}_2}$), 2.16 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1.2H, S- $\text{CH}_{2\text{a}}$), 2.04 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 0.8H, S- $\text{CH}_{2\text{b}}$), 1.73 (s, 3H, CH_3), 1.61 – 1.51 (m, 1.2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.47 – 1.37 (m, 0.8H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$). $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ (2 Rotamere) = 11.9 (CH_3), 26.0, 27.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 28.4, 28.8 (S- CH_2), 46.7, 46.5 (N- CH_2), 47.5, 47.7, 48.4 ($\text{CH}_2\text{-COOH/N-C(O)CH}_2$), 66.1, 66.3, 108.0, 108.1, 126.7, 126.8 ($3\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 128.0, 128.1, 129.1 ($6\times\text{CH}_{\text{Ar-Cq}}$, $6\times\text{CH}_{\text{Ar-CH}_{\text{Ar-Cq}}}$), 142.1, 142.2 ($\text{CH}_{\text{ar,Thymin}}$), 144.4, 144.5, 151.0, 164.4, 166.8, 167.3, 170.3, 170.8 (N- $\text{CH}_2\text{-C(O)}$, $\text{CH}_2\text{-C(O)-N}$, $2\times\text{C(O)-NH}_{\text{Thymin}}$, Cq-CH_3 , Cq,Trt). HRMS (ESI $^-$): $m/z = 556.1905$ ($\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}^-$ (M-H) $^-$), berechnet: 556.1911).

6.2.2.2 Synthese bivalenter Sialyl-LacNAc-Polyethylenglykol (PEG)-Konjugate

Für die Synthese bivalenter Trisaccharid-PEG-Konjugate wurden Polyethylenglykoldiamine als Ausgangsstoffe verwendet: ein monodisperses PEG-Diamin (molare Masse = 1250 g/mol, N = 27) wurde von *Polypure* (Oslo, Norwegen), die polydispersen PEG-Diamine wurden von *Sigma Aldrich* (mittlere molare Masse $M \approx 3000$ g/mol, N ≈ 67) und von *Rapp Polymere* (mittlere molare Masse $M \approx 6400$ g/mol, N ≈ 144) bezogen.



PEGylierung von 29 und Deblockierung der Trityl-Gruppe:

S-Tritylthiopropyl-N-[(1-thyminyl)-acetyl]-glycine (29) (8.9 mg, 16 μmol) und N-Hydroxysuccinimid (1.8 mg, 16 μmol) wurden in N,N-Dimethylformamid (600 μL)

gelöst und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC-HCl) (3.1 mg, 16 μmol) hinzugefügt und für 1 Stunde geschüttelt. Nach der Aktivierung wurde das PEG-Diamin

(4 μmol) hinzugegeben und über Nacht geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde unter verminder-
tem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser/Acetonitril (1:1, v/v) gelöst und mittels präpa-
rativer HPLC (50-90% B in 30 min) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und lyophi-
lisiert. UPLC: für $N = 27$: $t_R = 2.27$ min (50-90% B in 4 min), für $N \approx 67$: $t_R = 1.67$ min (50-90% B
in 2 min), für $N \approx 144$: $t_R = 2.10$ min (50-90% B in 4 min). Der Rückstand wurde in Dichlor-
methan/Trifluoressigsäure (1 mL, 95:5, v/v) gelöst. Die Zugabe von Triisopropylsilan (100 μL)
führte zu einer sofortigen Entfärbung der Lösung. Anschließend wurde Wasser (1 mL) hin-
zugefügt, das Dichlormethan im Argonstrom entfernt und die verbliebene Lösung lyophilisiert.
Der Rückstand wurde in Wasser/Acetonitril (1:1, v/v) gelöst und mittels präparativer HPLC (30-
90% B in 30 min) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Für **30**₂₇:
 t_R (UPLC) = 1.07 min (30-90% B in 2 min), ESI-MS: $m/z = 922.7$ ($\text{C}_{80}\text{H}_{148}\text{N}_8\text{O}_{35}\text{S}_{22}^{2+}$, berechnet:
923.1), 615.6 ($\text{C}_{80}\text{H}_{149}\text{N}_8\text{O}_{35}\text{S}_{22}^{3+}$, berechnet: 615.7); $\epsilon_{260} = 17600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 15% (2 Stufen);
für **30**₆₇: t_R (UPLC) = 1.77 (30-90% B in 4 min), MALDI/TOF-MS: $m/z = 3604$ ($\text{C}_{160}\text{H}_{307}\text{N}_8\text{O}_{75}\text{S}_{2+}$,
berechnet: 3605); $\epsilon_{260} = 17600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 31% (2 Stufen); für **30**₁₄₄: t_R (UPLC) = 3.09 min (30-
90% B in 4 min), MALDI/TOF-MS: $m/z = 7000\text{--}7500$ ($\text{C}_{314}\text{H}_{615}\text{N}_8\text{O}_{152}\text{S}_{2+}$, berechnet: 6995); $\epsilon_{260} =$
 $17600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 24% (2 Stufen).

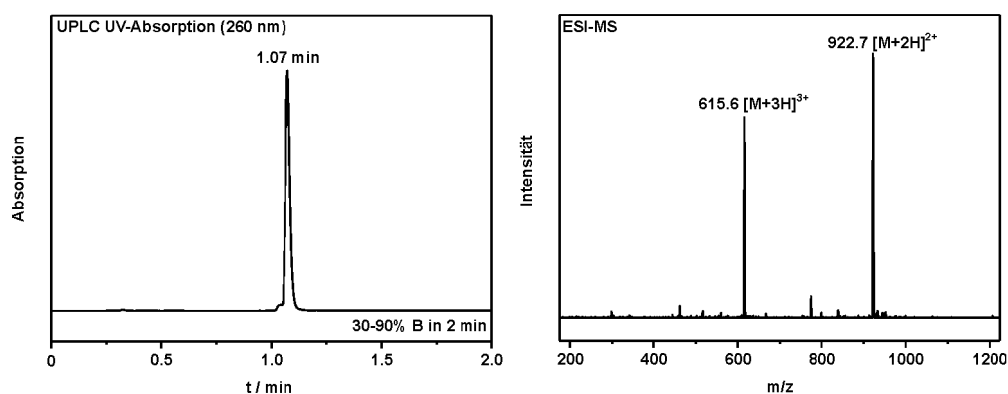


Abbildung 35: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) der gereinigten Verbindung **30**₂₇.

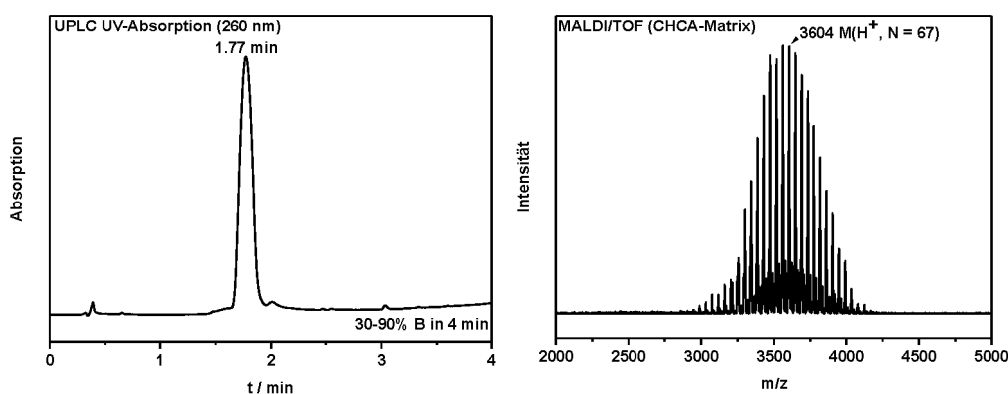


Abbildung 36: UPLC-Spur (links) und MALDI/TOF-Spektrum (rechts) der gereinigten Verbindung **30**₆₇.

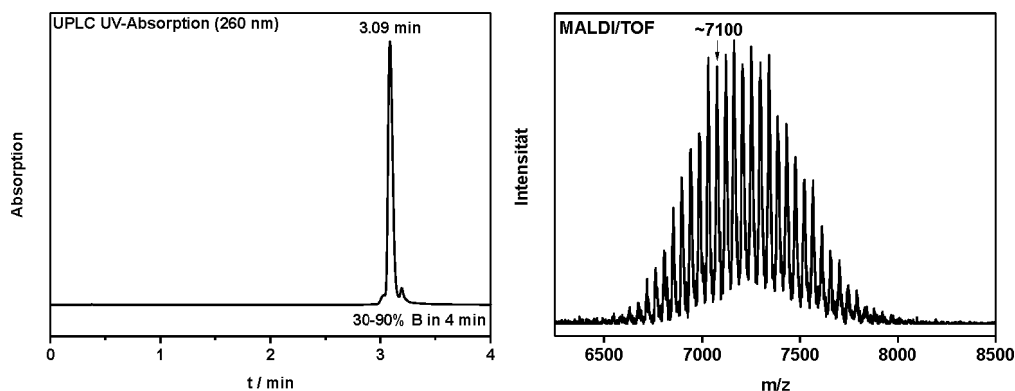
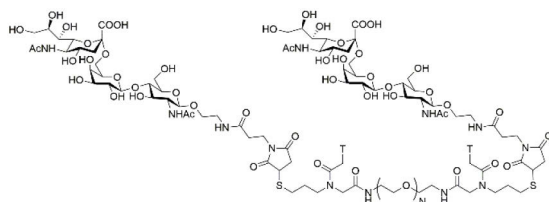


Abbildung 37: UPLC-Spur (links) und MALDI/TOF-MS-Spektrum (CHCA-Matrix, rechts) der gereinigten Verbindung **30₁₄₄**.



Ligation von Maleimido-Sialyl-LacNAc **18 an die zweifach-thiolmodifizierten PEG's **30₂₇**, **30₆₇** und **30₁₄₄**:** 1 Äquivalent thiol-modifiziertes PEG **30_x** (350 – 1000 μ M in Wasser, typische Ansatzgröße: 100 – 300 nmol) und 4 Äquivalente Maleimido-Sialyl-LacNAc **18** (5 – 20 mM in Wasser)

wurden mit frisch entgastem Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (10 mM, pH 6.5) zu einer PEG-Konzentration von 100 μ M verdünnt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und der Reaktionsfortschritt mittels UPLC verfolgt. Nach vollständigem Umsatz des thiolmodifizierten PEG wurde die Reaktionlösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Wasser (0.1% Trifluoressigsäure) gelöst und mittels semi-präparativer HPLC (3-90 % B in 30 min) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktionen wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine *Sep-Pak*® C18-Kartusche (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Nachdem die Kartusche mit Wasser (3 mL) gespült wurde, erfolgte die Elution des Produkts mit H₂O/MeCN/HCOOH (1:1:4*10⁻⁶, v/v/v, 6 mL). Nach Lyophilisierung konnte das gereinigte Produkt erhalten werden (Ausbeute: 34-82%). Für **PEG₂₉**: t_R (UPLC) = 2.10 min (3-90% B in 4 min), ESI-MS: m/z = 1194.6 (C₁₄₈ H₂₅₃ N₁₆ O₇₉ S₂³⁺, berechnet: 1194.9), 896.6 (C₁₄₈ H₂₅₄ N₁₆ O₇₉ S₂⁴⁺, berechnet: 896.4), 717.7 (C₁₄₈ H₂₅₅ N₁₆ O₇₉ S₂⁵⁺, berechnet: 717.4), 598.3 (C₁₄₈ H₂₅₆ N₁₆ O₇₉ S₂⁶⁺, berechnet: 598.0), ϵ_{260} = 17600 L mol⁻¹ cm⁻¹; für **PEG₅₀**: t_R (UPLC) = 1.88 min (20-90% B in 4 min), MALDI-TOF-MS: m/z = 5337 (C₂₂₈H₄₁₁N₁₆O₁₁₉S₂⁺, berechnet: 5342), ϵ_{260} = 17600 L mol⁻¹ cm⁻¹; für **PEG₇₉**: t_R (UPLC) = 2.52 min (3-90% B in 4 min), MALDI-TOF-MS: m/z = 8250-8500 ([M-SA]⁺: C₃₇₁H₇₀₁N₁₅O₁₈₈S₂⁺, berechnet: 8439), ϵ_{260} = 17600 L·mol⁻¹·cm⁻¹.

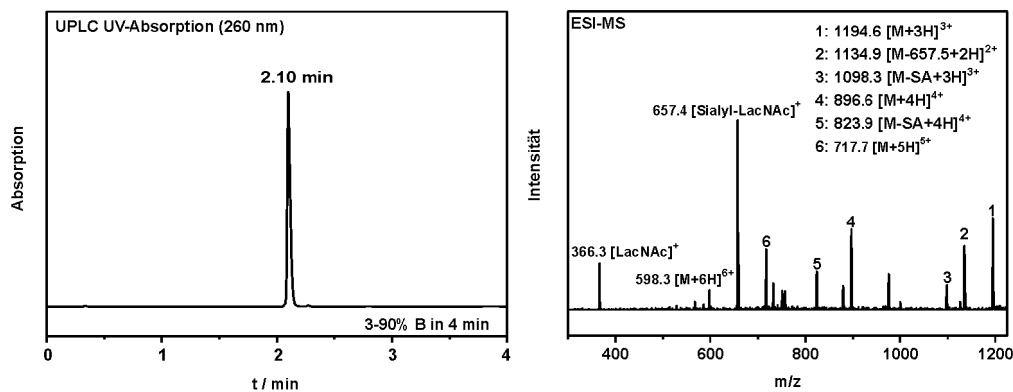


Abbildung 38: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) der gereinigten Verbindung **PEG₂₉**.

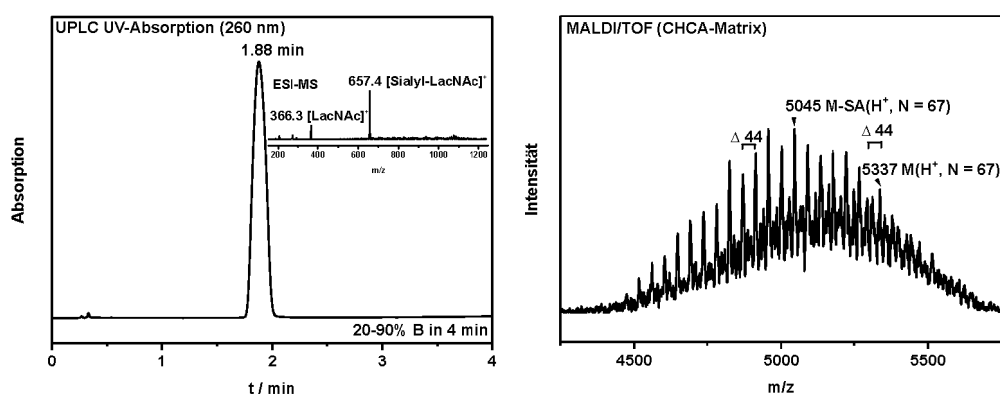


Abbildung 39: UPLC-Spur (links) und MALDI/TOF-MS-Spektrum (rechts) der gereinigten Verbindung **PEG₅₀**.

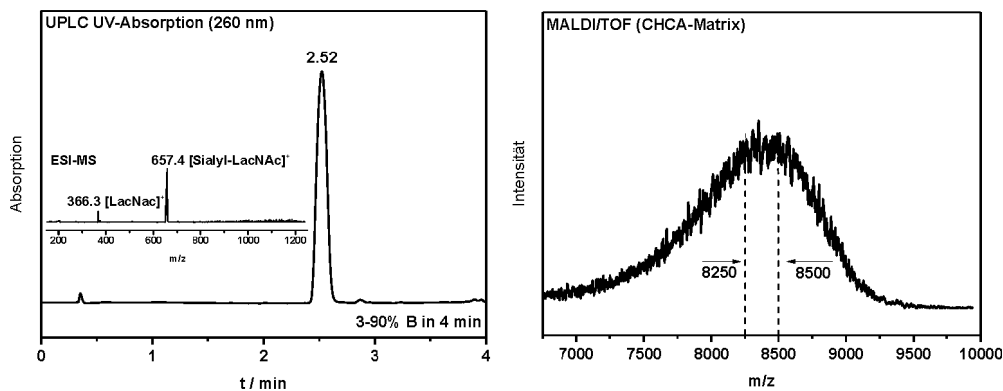
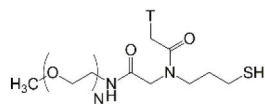


Abbildung 40: UPLC-Spur (links) und MALDI/TOF-MS-Spektrum (rechts) der gereinigten Verbindung **PEG₇₉**.

6.2.2.3 Synthese monovalenter Sialyl-LacNAc-Polyethylenglykol (PEG)-Konjugate

Für die Synthese monovalenter Trisaccharid-PEG-Konjugate dienten als Ausgangsverbindungen ein kurzes monodisperses Methoxy-PEG-Amin (Molare Masse: 163.2 g/mol, $N = 3$) und ein längeres polydisperses Methoxy-PEG-Amin (mittlere molare Masse $M \approx 2013$ g/mol, $N \approx 45$).



PEGylierung von **29** und Deblockierung der Trityl-Schutzgruppe:

S-Tritylthiopropyl-*N*-[(1-thymine)-acetyl]-glycine (**29**) (11.1 mg, 20 μ mol) und *N*-Hydroxysuccinimid (2.3 mg, 20 μ mol) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (600 μ L) gelöst und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC·HCl) (3.8 mg, 20 μ mol) hinzugefügt und für 1 Stunde geschüttelt. Anschließend wurde das Methoxy-PEG-Amin (20 μ mol) hinzugegeben und über Nacht geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril (1:1, v/v) gelöst und mittels präparativer HPLC (für $N = 3$: 30-90% B in 30 min, für $N \approx 45$: 50-90% B in 30 min) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. UPLC: für $N = 3$: $t_R = 2.52$ min (30-90% B in 4 min); für $N \approx 45$: $t_R = 2.08$ min (50-90% B in 4 min). Anschließend wurde das gereinigte Produkt in Dichlormethan (1 mL) gelöst und Silbernitrat hinzugefügt (100 μ mol, 500 mM in Wasser). Nachdem 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt wurde, wurde Dithiothreitol (100 μ mol, 500 mM in Wasser) hinzugegeben und für 5 Minuten geschüttelt. Die wässrige Phase wurde separiert und mit Dichlormethan (500 μ L) extrahiert. Zu den vereinigten organischen Phasen wurde Wasser gegeben (1 mL), Dichlormethan im Argon-Strom entfernt und die verbliebene Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Wasser/Acetonitril (1:1, v/v) gelöst und mittels präparativer HPLC (3-90% B in 30 min) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert (Ausbeuten: 10-22%, über 2 Stufen). Für **31_{m,1}**: t_R (UPLC) = 1.80 min (3-90% B in 4 min), ESI-MS: $m/z = 461.3$ ($C_{19}H_{33}N_4O_7S^+$, berechnet: 461.2), $\epsilon_{260} = 8800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. **31_{m,2}**: t_R (UPLC) = 2.79 min (3-90% B in 4 min), $\epsilon_{260} = 8800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. MALDI/TOF-MS: $m/z = 2303$ ($C_{103}H_{201}N_4O_{49}S^+$, berechnet: 2310).

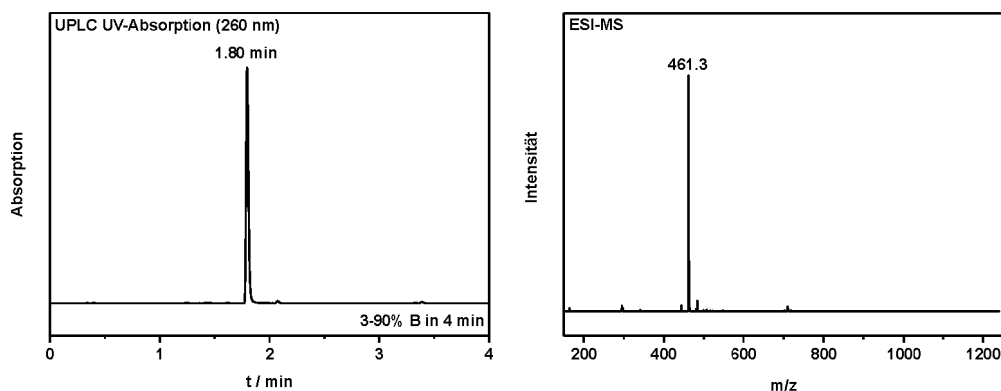


Abbildung 41: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) der gereinigten Verbindung **31_{m,1}**.

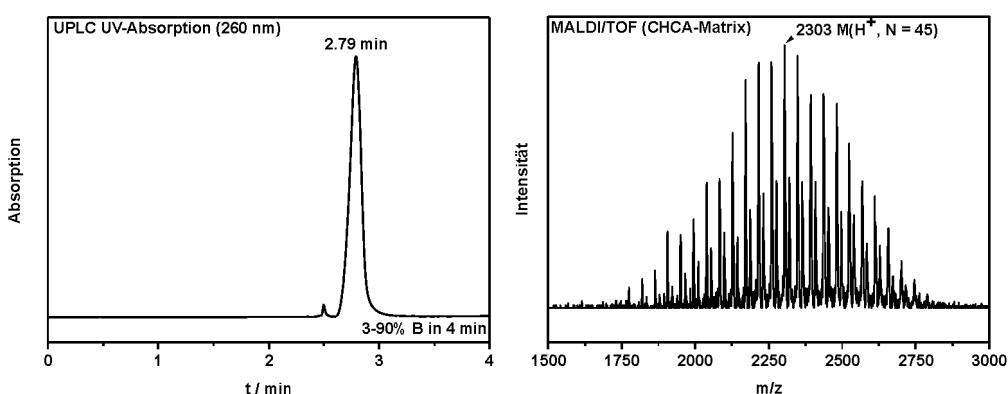
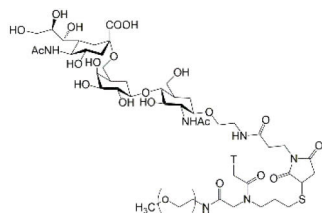


Abbildung 42: UPLC-Spur (links) und MALDI/TOF-MS-Spektrum (rechts) der gereinigten Verbindung **31_{m,2}**.



Ligation von Maleimido-Sialyl-LacNAc **18** an die einfach-thiolmodifizierten Polyethylenglykole **31_{m,1}** und **31_{m,2}**:

1 Äquivalent thiolmodifiziertes PEG **31_{m,x}** (350 – 1000 μM in Wasser, typische Ansatzgröße: 100 – 300 nmol) und 2 Äquivalente Maleimido-Sialyl-LacNAc **18** (5 – 20 mM in Wasser) wurden mit frisch entgastem Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (10 mM, pH 6.5) zu einer PEG-Konzentration von 100 μM verdünnt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und der Reaktionsfortschritt mittels UPLC verfolgt. Nach vollständigem Umsatz des thiolmodifizierten PEG wurde die Reaktionlösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Wasser (0.1% Trifluoressigsäure) gelöst und mittels semi-präparativer HPLC (3-90 % B in 30 min) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktionen wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung auf eine *Sep-Pak*[®] C18-Kartusche (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Nachdem die Kartusche mit Wasser (3 mL) gespült wurde, erfolgte die Elution des Produkts mit $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{HCOOH}$ (1:1:4*10⁻⁶, v/v/v, 6 mL). Nach Lyophilisierung konnte das gereinigte Produkt erhalten werden (Ausbeute: 62-89%).

Für **PEG_{m,1}**: t_R (UPLC) = 1.52 min (3-90% B in 4 min), ESI-MS: m/z = 665.7 ($C_{53}H_{86}N_8O_{29}S^{2+}$, berechnet: 665.7), ϵ_{260} = 8800 L·mol⁻¹·cm⁻¹. Für **PEG_{m,2}**: t_R (UPLC) = 2.44 min (3-90% B in 4 min), MALDI/TOF-MS: m/z = 3178 ($C_{137}H_{253}N_8O_{71}S^+$, berechnet: 3178), ϵ_{260} = 8800 L·mol⁻¹·cm⁻¹.

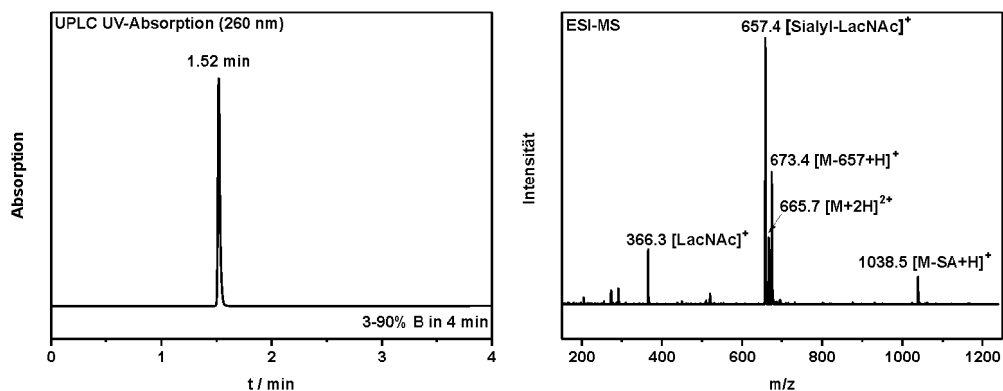


Abbildung 43: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des monovalenten Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugats **PEG_{m,1}**.

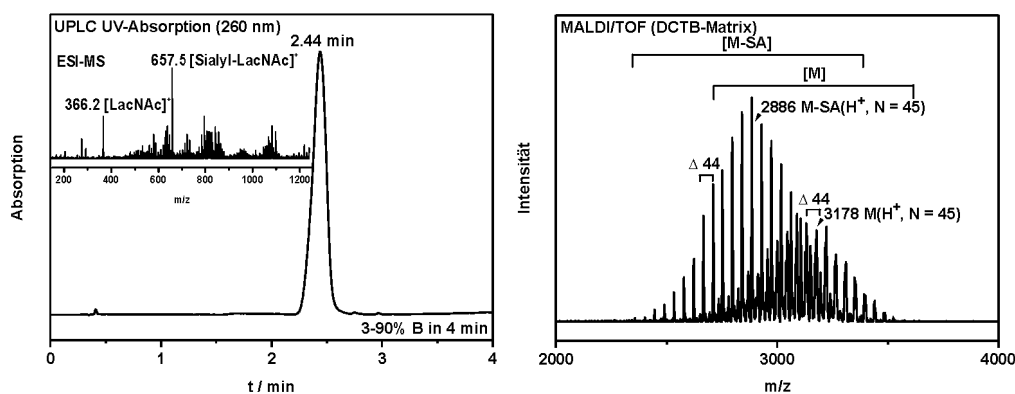


Abbildung 44: UPLC-Spur (links) und MALDI/TOF-MS-Spektrum (rechts) des monovalenten Sialyl-LacNAc-PEG-Konjugats **PEG_{m,2}**.

6.2.3 Synthese von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten

6.2.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Synthese von PNA-Oligomeren

Die automatisierte PNA Festphasensynthese wurde an einem Gerät des Typs ResPep von *Intavis* durchgeführt. Hierzu wurden Synthesereaktoren für den Mikro-Synthesemaßstab von *Intavis* verwendet. Als Syntheseharz kam TentaGel R RAM von *Rapp Polymers* mit einer typischen Beladung von $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ bei einem Syntheseansatz von $2 \text{ } \mu\text{mol}$ zum Einsatz.

In einem Reaktor wurde das Syntheseharz durch Zugabe von *N, N*-Dimethylformamid ($500 \text{ } \mu\text{L}$, 30 Minuten) gequollen. Entsprechend dem Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach Fmoc/Bhoc-Strategie (s.u.) wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (2x). Anschließend wurde die Aminosäure (2x), die PNA-Monomere und das rückgratmodifizierte PNA-Monomer **19** gekuppelt (je 2x). Nach erfolgter Doppelkupplung wurden verbliebene freie N-terminale Aminofunktionen durch Acetylierung blockiert (2x).

6.2.3.2 Protokoll zur automatisierten Festphasen-PNA-Synthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie

Fmoc-Abspaltung: $250 \text{ } \mu\text{L}$ DMF/Piperidin (4:1, v/v) wurden für 2 Minuten auf das Harz gegeben. Das Harz wurde mit $200 \text{ } \mu\text{L}$ DMF (3x) gewaschen.

Kupplung von Aminosäuren: $54 \text{ } \mu\text{L}$ HCTU (5.4 Äq., 0.2 M in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)), $30 \text{ } \mu\text{L}$ NMM (12.0 Äq., 0.8 M in NMP) und $40 \text{ } \mu\text{L}$ Boc-geschütztes Lysin (6.0 Äq., 0.3 M in NMP) wurden zur Voraktivierung vereinigt. Nach 2 Minuten wurde die Lösung zum Harz transferiert. Nach 45 Minuten wurde das Harz mit $200 \text{ } \mu\text{L}$ DMF (3x) gewaschen.

Kupplung der PNA-Monomere: $36 \text{ } \mu\text{L}$ HCTU (3.6 Äq., 0.2 M in NMP), $20 \text{ } \mu\text{L}$ NMM (8.0 Äq., 0.8 M in NMP) und $40 \text{ } \mu\text{L}$ PNA-Monomer (4.0 Äq., 0.2 M in NMP) wurden zur Voraktivierung vereinigt. Nach 2 Minuten wurde die Lösung zum Harz transferiert. Nach 45 Minuten wurde das Harz mit $200 \text{ } \mu\text{L}$ DMF (3x) gewaschen.

Blockierung der freien Aminogruppen: $250 \text{ } \mu\text{L}$ DMF/ Ac_2O /2,6-Lutidin (89:5:6, v/v/v) wurden für 2 Minuten zum Harz gegeben und anschließend mit DMF ($300 \text{ } \mu\text{L}$, 5x) gewaschen.

Freisetzung vom festen Träger und Bhoc-Abspaltung: Nach Kupplung des letzten PNA-Monomers wurde die N-terminale Aminofunktion deblockiert (Fmoc-Abspaltung). Nicht-thiolhaltige

PNA-Oligomere wurden durch Zugabe einer Lösung aus TFA/H₂O/*i*Pr₃SiH (1 mL, 90:5:5, v/v/v) and 5 mg L-Cysteinmethylester-Hydrochlorid und thiolhaltige PNA-Oligomere durch TFA/*i*Pr₃SiH/EDT/H₂O (1 mL, 89:6:3:3, v/v/v/v) vom festen Träger abgespalten. Nach 90 Minuten wurde die Suspension filtriert und das Harz mit TFA (250 µL, 2x) gewaschen. Zu den vereinigten Filtraten wurde kalter Diethylether (13.5 mL) gegeben, 5 Minuten auf Trockeneis gekühlt und für 15 Minuten (4000 UpM, 4 °C) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit kaltem Diethylether (1 mL) gewaschen und im Argon-Strom getrocknet.

Reinigung: Das Rohprodukt wurde in Wasser/Acetonitril (97:3, v/v) gelöst und mittels semi-präparativer HPLC (3-30 % B in 30 min) gereinigt und die Produktfraktion anschließend lyophilisiert.

H-cagtcagttcc-Lys-NH₂ (PNA₁, ————): Ausbeute: OD₂₆₀ = 32.8 (ϵ_{260} = 126100 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 260 nmol, 13%; t_R (UPLC): 1.69 min (3-30 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1208.6 (C₁₄₅H₁₉₁N₇₄O₄₁³⁺, berechnet: 1208.8), 906.9 (C₁₄₅H₁₉₂N₇₄O₄₁⁴⁺, berechnet: 906.9), 725.7 (C₁₄₅H₁₉₃N₇₄O₄₁⁵⁺, berechnet: 725.7), 605.3 (C₁₄₅H₁₉₄N₇₄O₄₁⁶⁺, berechnet: 604.9).

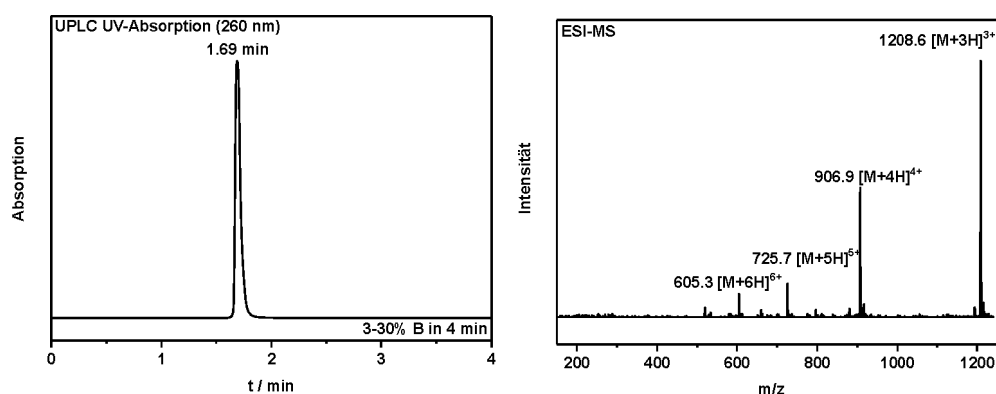


Abbildung 45: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers PNA₁.

H-aactcctgttgct-Lys-NH₂ (PNA₇, ————): Ausbeute: OD₂₆₀ = 21.8 (ϵ_{260} = 121200 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 180 nmol, 9%; t_R (UPLC): 1.83 min (3-30 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1205.3 (C₁₄₅H₁₉₂N₇₁O₄₃³⁺, berechnet: 1205.8), 904.4 (C₁₄₅H₁₉₃N₇₁O₄₃⁴⁺, berechnet: 904.6), 723.9 (C₁₄₅H₁₉₄N₇₁O₄₃⁵⁺, berechnet: 723.9), 603.4 (C₁₄₅H₁₉₅N₇₁O₄₃⁶⁺, berechnet: 603.4).

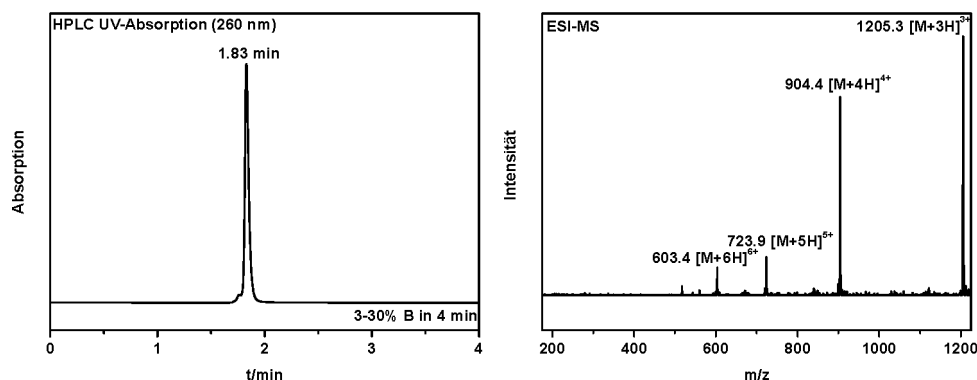


Abbildung 46: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers **PNA₇**.

H-aactcctgtt(~CH₂SH)gct-Lys-NH₂ (20): Ausbeute: OD₂₆₀ = 26.7 (ϵ_{260} = 121200 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 220 nmol, 11%; t_R (UPLC): 2.17 min (3-30 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1221.1 (C₁₄₆H₁₉₄N₇₁O₄₃S³⁺, berechnet: 1221.2), 915.7 (C₁₄₆H₁₉₅N₇₁O₄₃S⁴⁺, berechnet: 916.2), 733.0 (C₁₄₆H₁₉₆N₇₁O₄₃S⁵⁺, berechnet: 733.1), 610.9 (C₁₄₆H₁₉₇N₇₁O₄₃S⁶⁺, berechnet: 611.1).

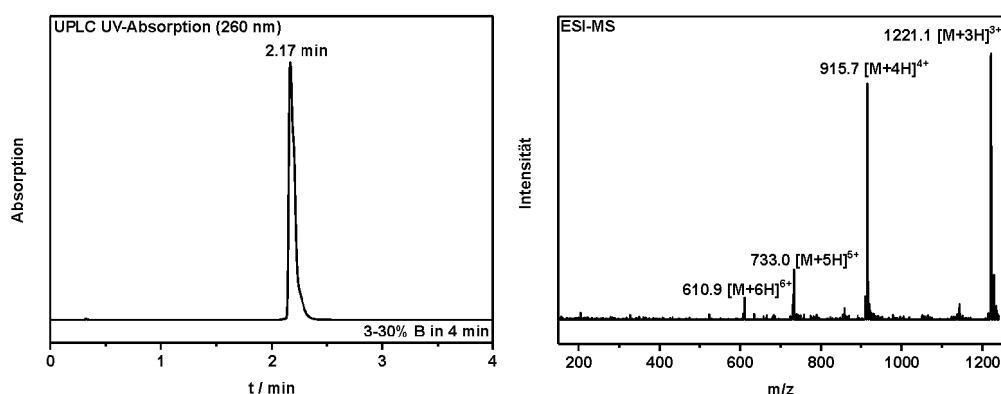


Abbildung 47: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers **H-aactcctgtt(~CH₂SH)gct-Lys-NH₂ (20)**.

H-ggcct(~CH₂SH)atgctaac-Lys-NH₂ (21): Ausbeute: OD₂₆₀ = 18.8 (ϵ_{260} = 129000 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 146 nmol, 7%; t_R (UPLC): 1.54 min (3-30 % B in 2 min). ESI-MS: m/z = 1232.3 (C₁₄₆H₁₉₂N₇₇O₄₀S³⁺, berechnet: 1232.5), 924.7 (C₁₄₆H₁₉₃N₇₇O₄₀S⁴⁺, berechnet: 924.7), 740.0 (C₁₄₆H₁₉₄N₇₇O₄₀S⁵⁺, berechnet: 739.9), 616.9 (C₁₄₆H₁₉₅N₇₇O₄₀S⁶⁺, berechnet: 616.8), 528.8 (C₁₄₆H₁₉₆N₇₇O₄₀S⁷⁺, berechnet: 528.8).

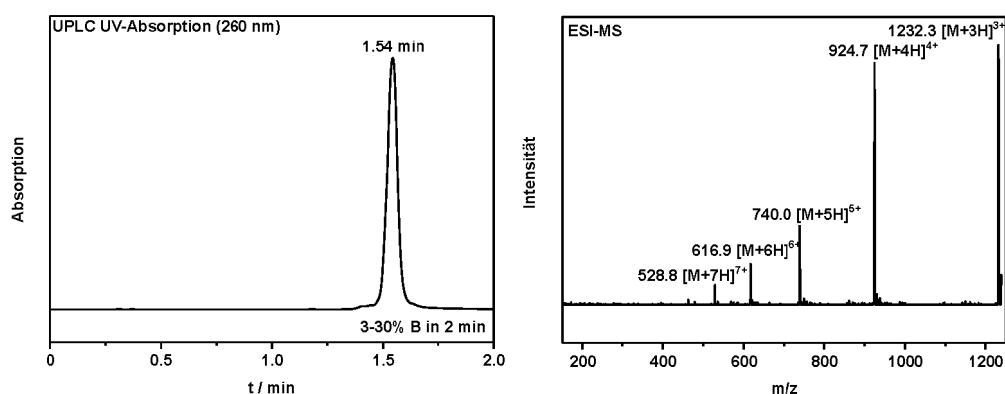


Abbildung 48: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers H-ggcct($\sim\text{CH}_2\text{SH}$)atgctaac-Lys-NH₂ (**21**).

H-ggcctatgct($\sim\text{CH}_2\text{SH}$)aac-Lys-NH₂ (22**):** Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 23.0$ ($\epsilon_{260} = 129000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 178 nmol, 9%; t_R (UPLC): 1.85 min (3 - 30 % B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1232.5$ ($\text{C}_{146}\text{H}_{192}\text{N}_{77}\text{O}_{40} \text{S}^{3+}$, berechnet: 1232.5), 924.8 ($\text{C}_{146}\text{H}_{193}\text{N}_{77}\text{O}_{40} \text{S}^{4+}$, berechnet: 924.7), 740.0 ($\text{C}_{146}\text{H}_{194}\text{N}_{77}\text{O}_{40} \text{S}^{5+}$, berechnet: 739.9), 616.8 ($\text{C}_{146}\text{H}_{195}\text{N}_{77}\text{O}_{40} \text{S}^{6+}$, berechnet: 616.8).

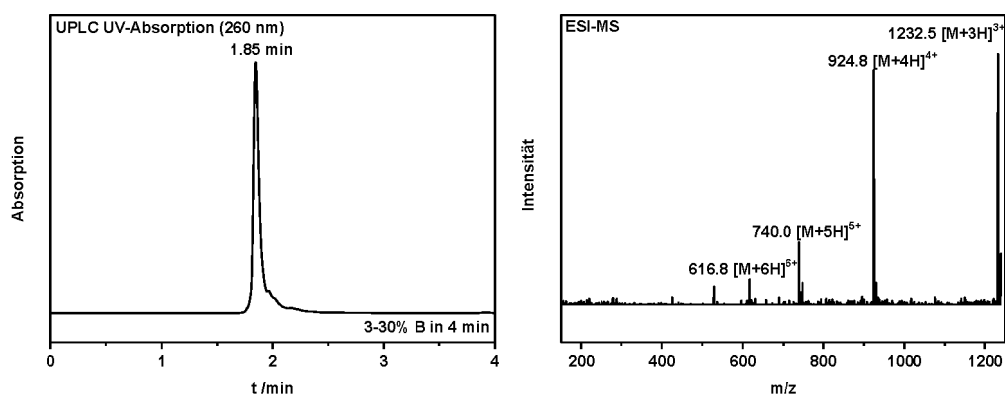


Abbildung 49: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers H-ggcctatgct($\sim\text{CH}_2\text{SH}$)aac-Lys-NH₂ (**22**).

H-aactcctt($\sim\text{CH}_2\text{SH}$)gtgct-Lys-NH₂ (23**):** Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 33.2$ ($\epsilon_{260} = 114600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 290 nmol, 15%; t_R (UPLC): 2.04 min (3 - 30 % B in 4min). ESI-MS: $m/z = 1221.1$ ($\text{C}_{146}\text{H}_{194}\text{N}_{71}\text{O}_{43} \text{S}^{3+}$, berechnet: 1221.2), 916.0 ($\text{C}_{146}\text{H}_{195}\text{N}_{71}\text{O}_{43} \text{S}^{4+}$, berechnet: 916.2), 733.3 ($\text{C}_{146}\text{H}_{196}\text{N}_{71}\text{O}_{43} \text{S}^{5+}$, berechnet: 733.1), 610.9 ($\text{C}_{146}\text{H}_{197}\text{N}_{71}\text{O}_{43} \text{S}^{6+}$, berechnet: 611.1).

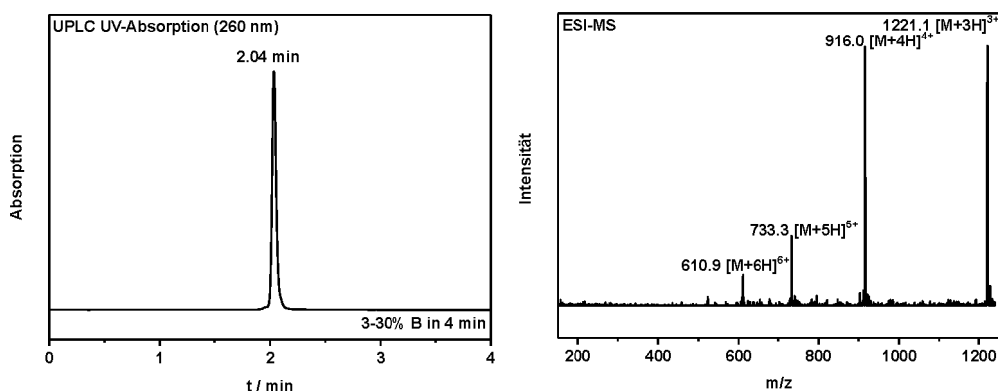


Abbildung 50: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers H-aactcctt(\sim CH₂SH)gtgct-Lys-NH₂ (**23**).

H-aactcctgtgt(\sim CH₂SH)ct-Lys-NH₂ (24**):** Ausbeute: OD₂₆₀ = 18.6 (ϵ_{260} = 116400 L·mol⁻¹·cm⁻¹), 160 nmol, 8%; t_R (UPLC): 1.93 min (3 - 30 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1220.9 (C₁₄₆H₁₉₄N₇₁O₄₃S³⁺, berechnet: 1221.2), 916.2 (C₁₄₆H₁₉₅N₇₁O₄₃S⁴⁺, berechnet: 916.2), 733.3 (C₁₄₆H₁₉₆N₇₁O₄₃S⁵⁺, berechnet: 733.1), 611.0 (C₁₄₆H₁₉₇N₇₁O₄₃S⁶⁺, berechnet: 611.1).

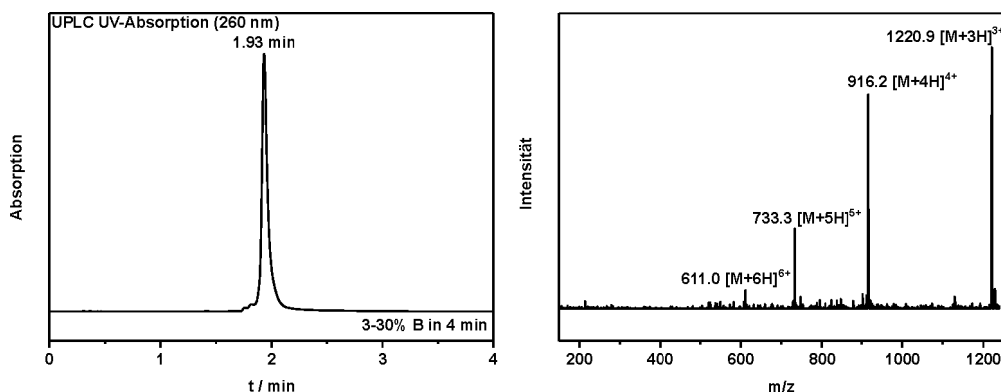



Abbildung 51: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers H-aactcctgtgt(\sim CH₂SH)ct-Lys-NH₂ (**24**).

6.2.3.3 Ligation von Maleimido-Sialyl-LacNAc an PNA-Konjugate

1 Äquivalent thioalkylierter PNA (**20-24**) (350 – 1000 μ M in Wasser; Ansatzgröße: 100 – 300 nmol) und 2 Äquivalente Maleimido-Sialyl-LacNAc **18** (5 – 20 mM in Wasser) wurden mit frisch entgastem Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (10 mM, pH 6.5) zu einer PNA-Konzentration von 100 μ M verdünnt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und der Reaktionsfortschritt mittels UPLC verfolgt (3-30 % B in 4 min). Nach vollständigem Umsatz der thioalkylierten PNA wurde die Reaktionlösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Wasser (0.1% Trifluoressigsäure) gelöst und mittels semi-präparativer HPLC (3-30 % B in 30 min) gereinigt. Das Acetonitril der Produktfraktionen wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene

wässrige Lösung auf eine *Sep-Pak*® C18-Kartusche (mit Wasser äquilibriert) gegeben. Nachdem die Kartusche mit Wasser (3 mL) gespült wurde, erfolgte die Elution des Produkts mit H₂O/MeCN/HCOOH (1:1:4*10⁻⁶, v/v/v, 6 mL). Nach Lyophilisierung konnte das gereinigte Produkt erhalten werden (Ausbeute: 49 – 90%).

H-aactcctgtt(CH₂S-Sialyl-LacNAc)gct-Lys-NH₂ (PNA₂, ): $\epsilon_{260} = 121200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; t_R (UPLC): 1.93 min (3 - 30 % B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1133.3$ (C₁₈₀H₂₄₇N₇₅O₆₅S⁴⁺, berechnet: 1133.4), 906.9 (C₁₈₀H₂₄₈N₇₅O₆₅S⁵⁺, berechnet: 906.9), 756.0 (C₁₈₀H₂₄₉N₇₅O₆₅S⁶⁺, berechnet: 755.9).

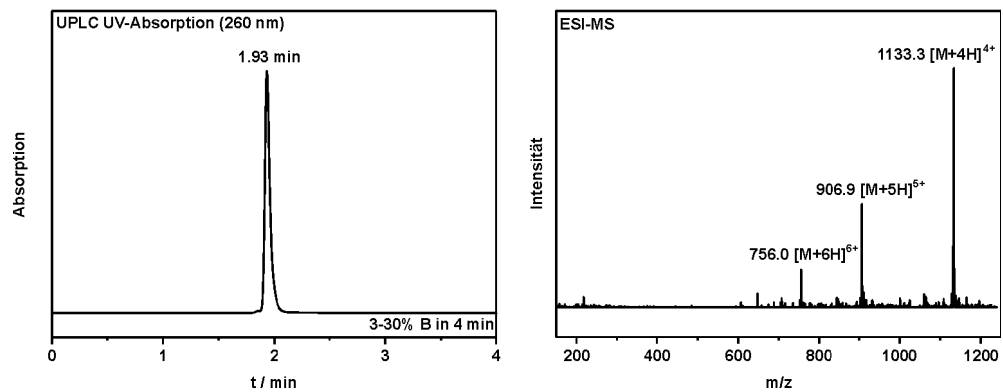



Abbildung 52: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers PNA₂.

H-ggcct(CH₂S-Sialyl-LacNAc)atgctaac-Lys-NH₂ (PNA₃, ): $\epsilon_{260} = 129000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; t_R (UPLC): 1.69 min (3 - 30 % B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1141.6$ (C₁₈₀H₂₄₅N₈₁O₆₂S⁴⁺, berechnet: 1141.9), 913.8 (C₁₈₀H₂₄₆N₈₁O₆₂S⁵⁺, berechnet: 913.7), 761.9 (C₁₈₀H₂₄₇N₈₁O₆₂S⁶⁺, berechnet: 761.6).

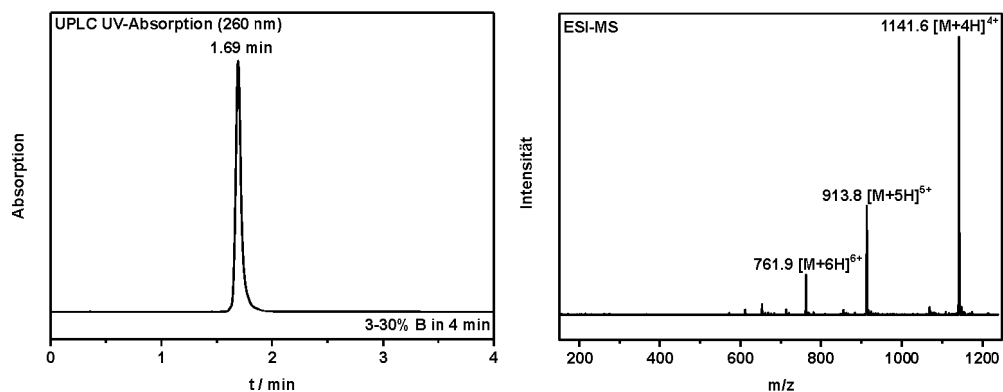



Abbildung 53: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers PNA₃.

H-ggcctatgct(CH₂S~Sialyl-LacNAc)aac-Lys-NH₂ (PNA₄, ): $\epsilon_{260} = 129000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; t_R (UPLC): 1.84 min (3 - 30 % B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1141.8$ (C₁₈₀H₂₄₅N₈₁O₆₂S⁴⁺, berechnet: 1141.8), 914.0 (C₁₈₀H₂₄₆N₈₁O₆₂S⁵⁺, berechnet: 914.0), 761.9 (C₁₈₀H₂₄₇N₈₁O₆₂S⁶⁺, berechnet: 761.6).

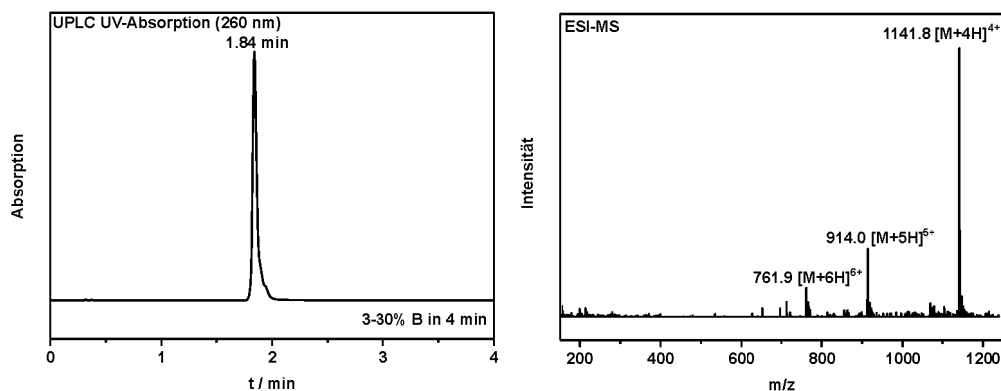



Abbildung 54: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers PNA₄.

H-aactcctt(CH₂S~Sialyl-LacNAc)gtgct-Lys-NH₂ (PNA₅, ): $\epsilon_{260} = 114600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; t_R (UPLC): 1.92 min (3 - 30 % B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1133.1$ (C₁₈₀H₂₄₇N₇₅O₆₅S⁴⁺, berechnet: 1133.4), 906.7 (C₁₈₀H₂₄₈N₇₅O₆₅S⁵⁺, berechnet: 906.9), 756.5 (C₁₈₀H₂₄₉N₇₅O₆₅S⁶⁺, berechnet: 755.9).

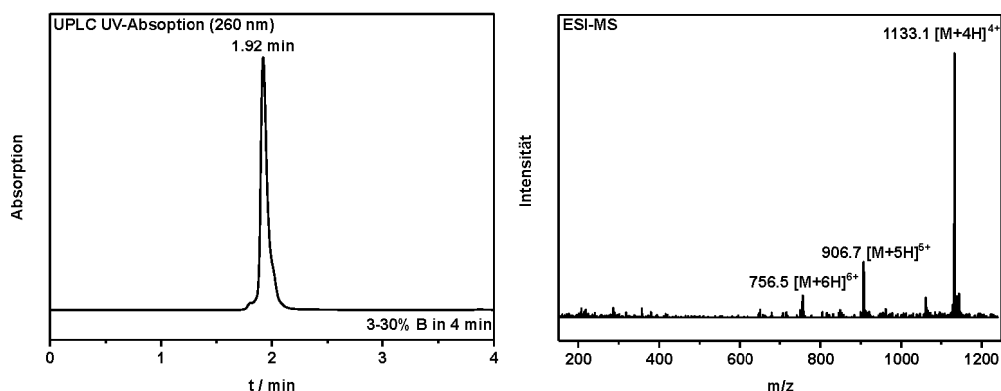



Abbildung 55: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers PNA₅.

H-aactcctgtgt(CH₂S~Sialyl-LacNAc)ct-Lys-NH₂ (PNA₆, ): $\epsilon_{260} = 116400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; t_R (UPLC): 1.79 min (3 - 30 % B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1133.2$ (C₁₈₀H₂₄₇N₇₅O₆₅S⁴⁺, berechnet: 1133.4), 906.9 (C₁₈₀H₂₄₈N₇₅O₆₅S⁵⁺, berechnet: 906.9), 755.7 (C₁₈₀H₂₄₉N₇₅O₆₅S⁶⁺, berechnet: 755.9).

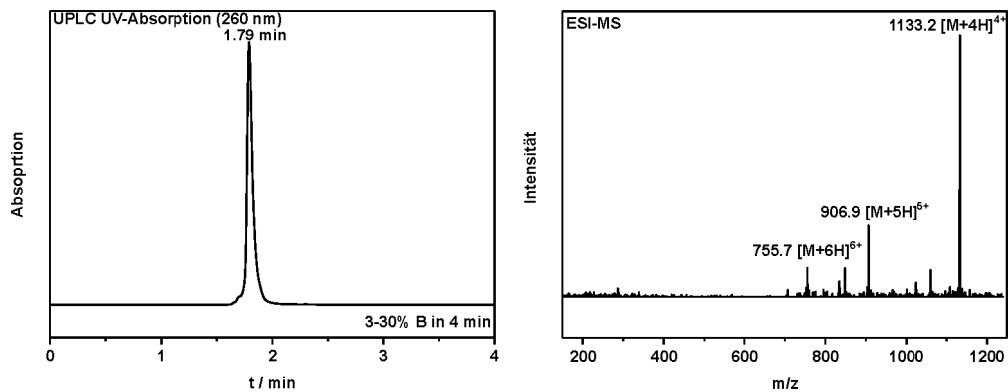


Abbildung 56: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Oligomers PNA_6 .

6.2.4 Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten

6.2.4.1 Protokoll zur automatisierten Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde in einer Ansatzgröße von 25 μmol unter Verwendung von 5 mL Spritzenreaktoren von *Intavis* an einem Gerät des Typs *MultiPep RS* von *Intavis* durchgeführt. Die ersten 10 Aminosäuren wurden einfachgekuppelt und alle nachfolgenden Aminosäuren doppeltgekuppelt.

Fmoc-Abspaltung: Das Harz wurde zweimal mit 800 μL DMF/ Piperidin (4:1, v/v) (1x 6 Minuten, 1x 4 Minuten) behandelt.

Kupplung: In einem Voraktivierungsbehälter wurden DMF-Lösungen aus Aminosäurederivat/*Oxyma Pure* (335 μL , 0.5 M), HCTU (320 μL , 0.5 M), NMM (100 μL , 4 M) und 40 μL DMF gegeben und homogenisiert. Nach einer Voraktivierungszeit von 1 Minute wurde die Lösung auf den Spritzenreaktor gegeben. Nach einer Kupplungszeit von 45 Minuten wurde das Harz mit DMF (800 μL , 3x) gewaschen.

Blockierung der freien Aminogruppen: 800 μL DMF/ Ac_2O /2,6-Lutidin (89:5:6, v/v/v) wurden für 5 Minuten zum Harz gegeben und anschließend mit DMF (800 μL , 2x) gewaschen.

Im Anschluss an den letzten Kupplungszyklus wurde das Harz mit DMF (500 μL , 3x) und DCM (1000 μL , 6x) gewaschen.

Abspaltung vom festen Träger: Das Harz (2 μmol) wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Lösung von TFA/TIS/ H_2O (1500 μL , 95:2.5:2.5 v/v/v) behandelt, filtriert und die Abspaltungsmischung in ein Plastikgefäß (15 mL) überführt. Das Rohpeptid wurde durch Zugabe von Diethylether ausgefällt (Ether/Abspalllösung 10:1, v/v, 5 Minuten über Trockeneis). Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen.

Reinigung: Das Rohprodukt wurde in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ (1:1:X, X möglichst klein in Abhängigkeit der Löslichkeit des Peptids) gelöst, mittels präparativer HPLC (3-90 % B in 30 min) gereinigt und die Produktfraktionen anschließend lyophilisiert. Die Ausbeuten für die gereinigten Peptide betrugen 18-30 % (bestimmt mittels Auswaage).

H-ARDFYDYDVFFYAMD-CONH₂ (PeB): t_R (UPLC): 2.46 min (3 – 90 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 977.4 ($\text{C}_{92}\text{H}_{118}\text{N}_{19}\text{O}_{27}\text{S}^{2+}$, berechnet: 977.6).

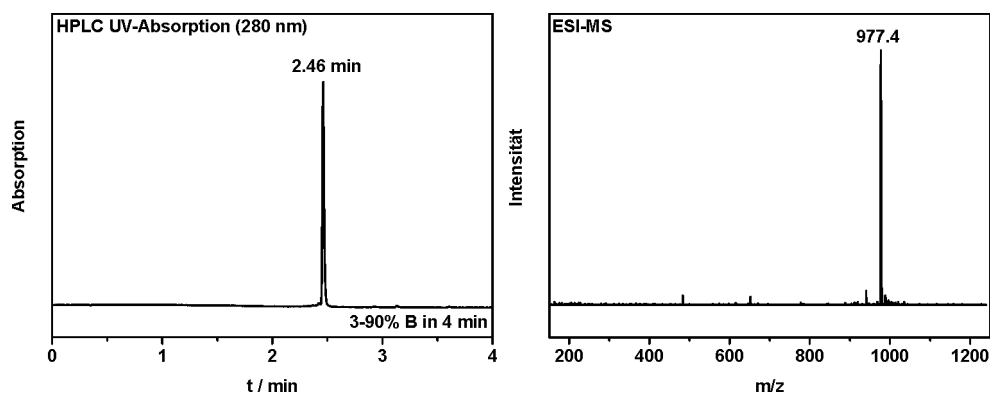


Abbildung 57: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten Peptids **PeB**.

H-K-ARDFYDYDVFFYAMD-CONH₂ (K-PeB): t_R (UPLC): 2.34 min (3 – 90 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1041.5 ($\text{C}_{98}\text{H}_{131}\text{N}_{21}\text{O}_{28}\text{S}^{2+}$, berechnet: 1041.6), 694.6 ($\text{C}_{98}\text{H}_{132}\text{N}_{21}\text{O}_{28}\text{S}^{3+}$, berechnet: 694.8).

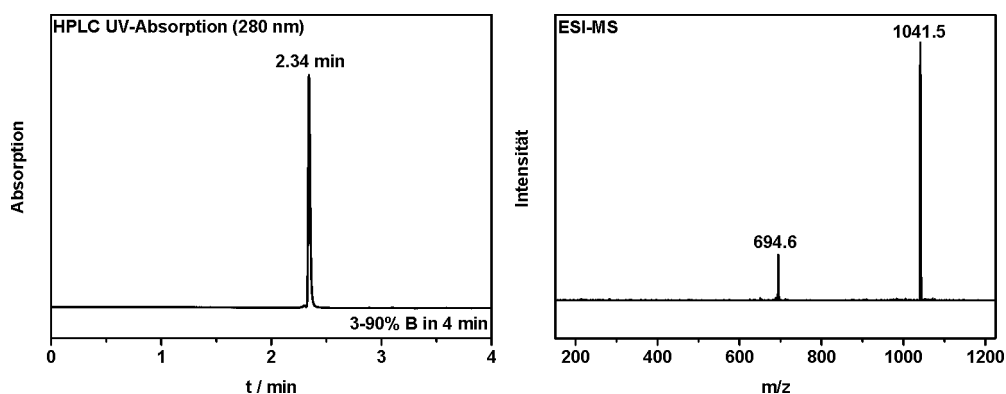


Abbildung 58: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten Peptids **K-PeB**.

H-KK-ARDFYDYDVFFYYAMD-CONH₂ (K₂-PeB): t_R (UPLC): 2.36 min (3 – 90 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1105.8 (C₁₀₄H₁₄₃N₂₃O₂₉S²⁺, berechnet: 1105.7), 737.5 (C₁₀₄H₁₄₄N₂₃O₂₉S³⁺, berechnet: 737.5).

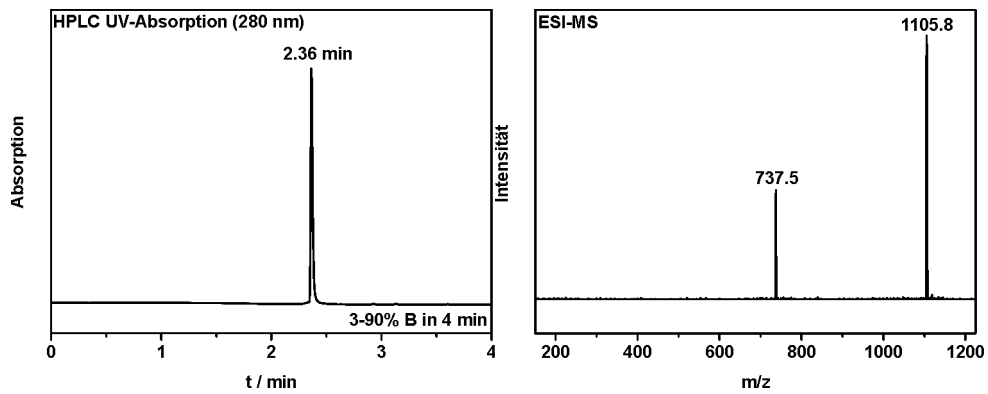


Abbildung 59: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten Peptids **K₂-PeB**.

H-KKK-ARDFYDYDVFFYYAMD-CONH₂ (K₃-PeB): t_R (UPLC): 2.35 min (3 – 90 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1169.5 (C₁₁₀H₁₅₅N₂₅O₃₀S²⁺, berechnet: 1169.8), 780.1 (C₁₁₀H₁₅₆N₂₅O₃₀S³⁺, berechnet: 780.2).

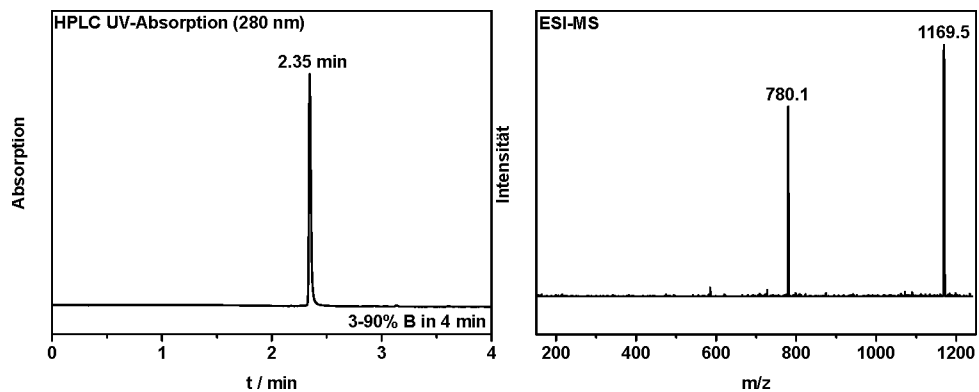


Abbildung 60: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten Peptids **K₃-PeB**.

H-KKKK-ARDFYDYDVFFYYAMD-CONH₂ (K₄-PeB): t_R (UPLC): 2.20 min (3 – 90 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1234.1 (C₁₁₆H₁₆₇N₂₇O₃₁S²⁺, berechnet: 1233.9), 822.9 (C₁₁₆H₁₆₈N₂₇O₃₁S³⁺, berechnet: 822.9), 617.4 (C₁₁₆H₁₆₉N₂₇O₃₁S⁴⁺, berechnet: 617.4).

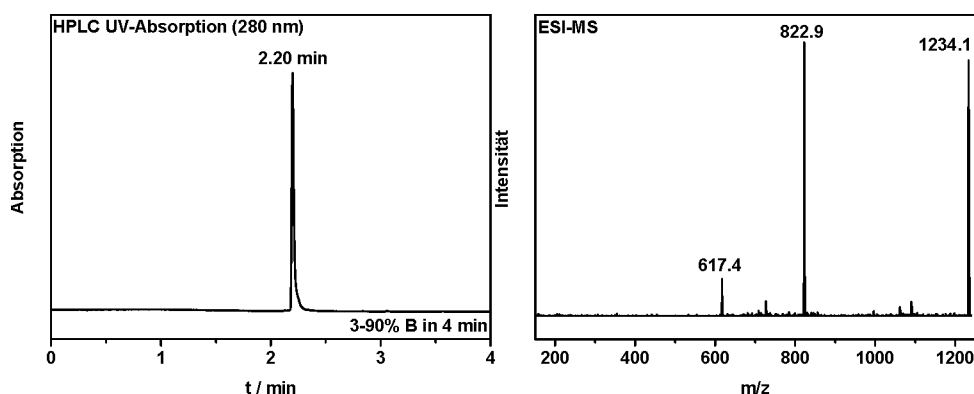


Abbildung 61: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten Peptids **K₄-PeB**.

H-ARDFYDYDVFFYAMD-KK-CONH₂ (PeB-K₂): t_R (UPLC): 2.13 min (3 – 90 % B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1105.5$ ($C_{104}H_{143}N_{23}O_{29}S^{2+}$, berechnet: 1105.7), 737.5 ($C_{104}H_{144}N_{23}O_{29}S^{3+}$, berechnet: 737.5).

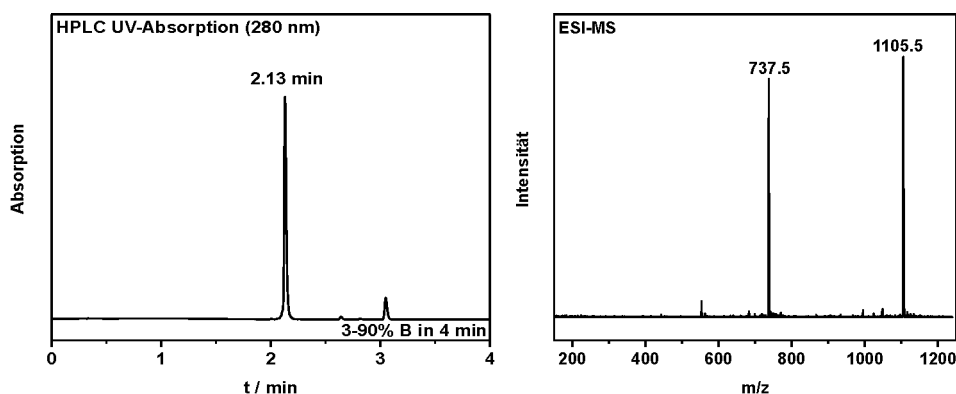
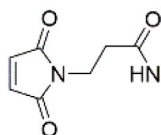


Abbildung 62: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten Peptids **PeB-K₂**.

6.2.4.2 Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten

Synthese von Maleimid-funktionalisierten Peptiden: Die Peptide wurden nach dem beschriebenen Protokoll der automatisierten Festphasen-Peptidsynthese synthetisiert (Kapitel 6.2.4.1), aber nicht vom Harz abgespalten. Das Harz wurde 15 Minuten in DMF gequollen, analog zum obigen Protokoll die terminale Fmoc-Gruppe entfernt und das Harz mit DMF (3 mL, 5x) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von DIPEA (8 Äq., bezogen auf die ursprüngliche Beladung des Harzes, 320 mM in DMF) und *N*-Succinimidyl-3-maleimidopropionat^[147-148] (4 Äq. bezogen auf die ursprüngliche Beladung des Harzes, 38 mM in DMF) und für 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert und erneut DIPEA (2 Äq., bezogen auf die ursprüngliche Beladung des Harzes, 320 mM in DMF) und *N*-Succinimidyl-3-maleimidopropionat^[147-148] (1 Äq., bezogen auf die ursprüngliche Beladung des Harzes, 38 mM in DMF) zugegeben und für 30 Minuten geschüttelt. Das Harz wurde filtriert, mit DMF (3 mL, 5x) und DCM (3 mL, 5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend erfolgte die Abspaltung vom festen Träger analog Kapitel 6.2.4.1. Die

Reinigung der Rohprodukte wurde mittels präparativer HPLC (3-80 % B in 30 min) vorgenommen, die vereinigten Produktfraktionen anschließend lyophilisiert und das Produkt in einer Ausbeute von 13 % erhalten (photometrisch, $\epsilon_{280} = 5120 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).



Maleimido-ARDFYDYDVFFYYAMD-KK-CONH₂ (33):

t_R (UPLC): 2.21 min (3-90% B in 4 min). MALDI-TOF-

MS: $m/z = 2361$ ($\text{C}_{111}\text{H}_{146}\text{N}_{23}\text{O}_{33}\text{S}^+$, berechnet: 2361).

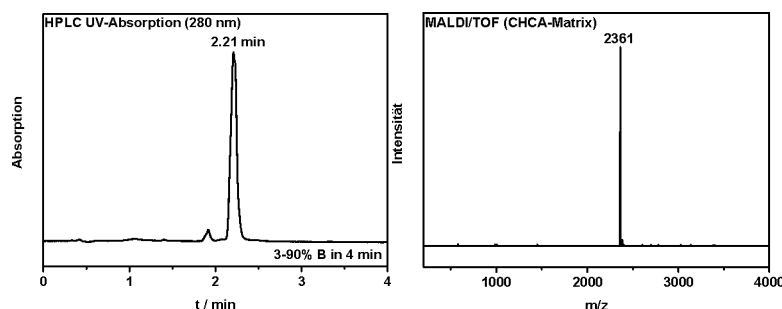


Abbildung 63: UPLC-Spur (links) und MALDI/TOF-Spektrum des maleimidfunktionalisierten Peptids PeB-K₂ **33**.

Ligation von maleimidfunktionalisierten Peptiden an thioalkylierte PNA-Oligomere:

1 Äquivalent thioalkylierter PNA (350 – 1000 μM in Wasser, Ansatzgröße: 100 – 300 nmol) und 2 Äquivalente Maleimido-Peptid **33** (5 – 20 mM in Wasser) wurden mit frisch entgastem Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (10 mM, pH 6.5) zu einer PNA-Konzentration von 100 μM verdünnt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und der Reaktionsfortschritt mittels UPLC verfolgt (3-90 % B in 4 min). Nach vollständigem Umsatz der thioalkylierten PNA wurde die Reaktionlösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Trifluoressigsäure gelöst und mittels semi-präparativer HPLC (3-90 % B in 40 min) gereinigt. Anschließend wurde das Acetonitril der Produktfraktionen unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert (Ausbeute: $\approx 90\%$).

H-aactcctgtt(~ARDFYDYDVFFYYAMD-KK)gct-K-NH₂ (PeB-K₂-PNA1): t_R (UPLC): 1.89 min (3 – 90% B in 4 min). ESI-MS: $m/z = 1205.3$ ($\text{C}_{257}\text{H}_{341}\text{N}_{94}\text{O}_{76}\text{S}_2^{5+}$, berechnet: 1205.4), 1004.7 ($\text{C}_{257}\text{H}_{342}\text{N}_{94}\text{O}_{76}\text{S}_2^{6+}$, berechnet: 1004.7), 861.3 ($\text{C}_{257}\text{H}_{343}\text{N}_{94}\text{O}_{76}\text{S}_2^{7+}$, berechnet: 861.3).

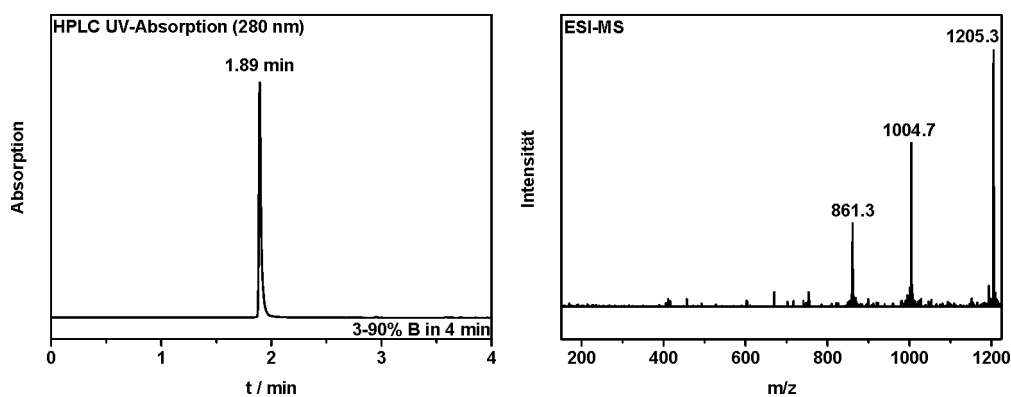


Abbildung 64: UPLC-UV-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Peptid-Konjugates **PeB-K₂-PNA1**.

H-ggcct(~ARDFYDYDVFFYYAMD-KK)atgctaac-K-NH₂ (PeB-K₂-PNA2): t_R (UPLC): 1.88 min (3 – 90 % B in 4 min). ESI-MS: m/z = 1211.9 ($C_{257}H_{339}N_{100}O_{73}S_2^{5+}$, berechnet: 1212.2), 1010.2 ($C_{257}H_{340}N_{100}O_{73}S_2^{6+}$, berechnet: 1010.3), 866.1 ($C_{257}H_{341}N_{100}O_{73}S_2^{7+}$, berechnet: 866.1), 758.0 ($C_{257}H_{342}N_{100}O_{73}S_2^{8+}$, berechnet: 758.0).

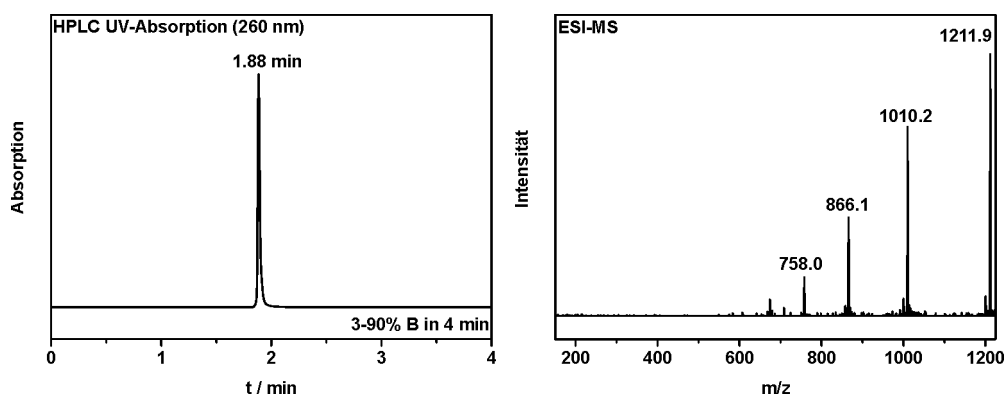


Abbildung 65: UPLC-Spur (links) und ESI-MS-Spektrum (rechts) des gereinigten PNA-Peptid-Konjugates **PeB-K₂-PNA2**.

6.2.5 Synthese von DNA-Concatemeren

6.2.5.1 Zyklisierung linearer DNA-Sequenzen

Nachdem alle Reaktionskomponenten (Tabelle 7 und Tabelle 8) zueinander pipettiert wurden, wurde die Mischung für 10 Stunden bei 60°C inkubiert. Im Anschluss wurde die CircLigase für 10 Minuten bei 80°C deaktiviert. Um nicht umgesetzte einzelsträngige DNA-Substrate S_x zu entfernen, wurden diese mithilfe der Exonuklease III (0.5 U/ μ L) und Exonuklease I (0.05 U/ μ L) bei 37°C während einer 45-minütigen Inkubationszeit abgebaut. Die beiden Enzyme wurden anschließend bei 65°C für 10 Minuten deaktiviert und das zyklisierte Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Um die Umsetzung dieser Reaktion zu kontrollieren, wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (20% Polyacrylamid, 7 M Harnstoff) durchgeführt. Um die Zyklisierungsausbeute abschätzen zu können, wurde das Verhältnis der Bandenintensitäten des linearen DNA-Substrats S_x und des zirkulären DNA-Produkts CP_x ermittelt.

Tabelle 7: Komponenten der Zyklisierungsreaktion entsprechend den Herstellerangaben von *Epicentre*®, typische Substratmengen: 10-100 pmol.

Menge	Komponenten	Endkonzentration
x μ L	Steriles Wasser	---
10 pmol	Lineares DNA-Substrat (S_x)	0.5 pmol/ μ L
2 μ L	CircLigase 10x Puffer	1x
1 μ L	1 mM ATP	50 μ M
1 μ L	50 mM $MnCl_2$	2.5 mM
1 μ L	CircLigase™ ssDNA Ligase	5 U/ μ l
20 μ L	Gesamtvolumen	

Tabelle 8: Verwendete lineare DNA-Substrate S_x (PAGE-gereinigt und 5'-Phosphatmodifiziert).

DNA-Sequenz (5'→3')	nt	Zirkuläres Produkt
S₁ GGG AAG TGG CCG TAG GAT AAA TAA TTC AAT AAA GAT GTC GTT TTG CTA GT	50	CP₁
S₂ TCA TAG TTC CGG CCT ATG CTA ACA ACT CCT GTT GCT CAG	39	CP₂
S₃ TCA TAG TTC CGG CCT ATG CTA ACA ACT CCT GTT GCT CAG AGC T	43	CP₃
S₄ GAG AGT CAG TCA GGA ATT TTT AAA GGA GGG AGG GGA ATT TTT ACA GCG AGC GTC TAC ATT TTT ACA CCA GCC AGC CAA CTT TTT TTT ATG CAT CGT CAG TTA G ^[151]	103	CP₄

6.2.5.2 Rolling Circle Amplification (RCA) zirkulärer DNA-Sequenzen

Nachdem die Reaktionsmischung (Tabelle 9, Tabelle 10) vereint wurde, wurde diese bei 30°C (90 Minuten bis zu 10 Stunden) inkubiert. Anschließend wurde die Polymerase für 10 Minuten bei 65°C deaktiviert. Die Aufreinigung des Rohprodukts wurde mit einem *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche durchgeführt. Dazu wurden 100 µL des RCA-Ansatzes mit 500 µL des Bindepuffers (3 M Guanidinium-Thiocyanat, 10 mM Tris/HCl (pH 6.6), Ethanol (5%, v/v)) gemischt. Die Probe wurde in das Filtrationsgefäß pipettiert und für 30 Sekunden zentrifugiert (13.000 x g). Der im Durchlauf befindliche überschüssige Primer, freie Nukleotide und kürzere DNA-Fragmente (<100 Basenpaaren), wurden verworfen und anschließend Waschpuffer (500 µL; 20 mM NaCl und 2 mM Tris/HCl (pH 7.5) in Ethanol) in das Filtrationsgefäß gegeben und für 1 Minute zentrifugiert (13.000 x g). Der Waschschrift wurde mit 200 µL Waschpuffer wiederholt. Abschließend wurde Elutionspuffer (50 µL, 10 mM Tris/HCl (pH 8.5), 1 mM EDTA) in das Filtrationsgefäß gegeben und 1 Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Um die elektrophoretische Mobilität der RCA-Produkte zu untersuchen, wurden 0.6% Agarose-Gele angefertigt (Abbildung 25C und Kapitel 6.1.8).

Tabelle 9: Komponenten der RCA-Reaktionsmischung (typische Menge an zirkulärer DNA: 10-100 pmol).

Menge	Komponente	Endkonzentration
x µL	Steriles Wasser	---
20 pmol	zirkuläre DNA (CP_x)	50 nM
20 µL	100 µM Starter-DNA (Primer)	5000 nM
8 µL	25 mM dNTP	0.5 mM
20 µL	Phi29 DNA-Polymerase (10 U/µL)	0.5 U/ µL
40 µL	Phi29-Puffer 10x	1x
400 µL	Gesamtvolumen	

Tabelle 10: Verwendete Primer ($\mathbf{P_x}$) in den RCA-Reaktionen.

DNA-Primer Sequenz (5' → 3')		Primer ($\mathbf{P_x}$) + zirkuläre DNA ($\mathbf{CP_x}$) → RCA-Produkt ($\mathbf{RCA_x}$)
$\mathbf{P_1}$	TAT TTA TCC TAC GGC CAC TT	$\mathbf{P_1 + CP_1 \rightarrow RCA_1}$
$\mathbf{P_{1,Cy3}}$	Cy3-TAT TTA TCC TAC GGC CAC TT	$\mathbf{P_{1,Cy3} + CP_1 \rightarrow RCA_2}$
$\mathbf{P_2}$	CTG AGC AAC AGG AGT TGT TA	$\mathbf{P_2 + CP_2 \rightarrow RCA_3; P_2 + CP_3 \rightarrow RCA_4}$
$\mathbf{P_{2,Cy3}}$	Cy3-CTG AGC AAC AGG AGT TGT TA	$\mathbf{P_{2,Cy3} + CP_2 \rightarrow RCA_5}$
$\mathbf{P_3}$	AAA AAT TCC TGA CTG ACT CTC ^[151]	$\mathbf{P_3 + CP_4 \rightarrow RCA_6}$

Spektrophotometrische Bestimmung der Gesamtmasse an RCA-Produkt:

Am Spektrophotometer (Nanodrop) wurde die Absorbanz E_λ bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die Gesamtmasse des RCA-Produkts m wurde unter Verwendung des Lambert-Beer-schen Gesetzes nach

$$m = \frac{A_{260} M V}{\epsilon_{260} d}$$

bestimmt, wobei der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} ($\mathbf{RCA_x}$) der DNA-Tandemwiederholungseinheit von $\mathbf{RCA_x}$ ($(\epsilon_{260}(\mathbf{RCA1}) = \epsilon_{260}(\mathbf{RCA2}) = 474300 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm}), \epsilon_{260}(\mathbf{RCA3}) = \epsilon_{260}(\mathbf{RCA5}) = 392300 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm}), \epsilon_{260}(\mathbf{RCA4}) = 427700 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm}), \epsilon_{260}(\mathbf{RCA6}) = 986500 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm}))$) und die molare Masse M der DNA-Tandemwiederholungseinheit von $\mathbf{RCA_x}$ ($M(\mathbf{RCA1}) = M(\mathbf{RCA2}) = 15198 \text{ g/mol}, M(\mathbf{RCA3}) = M(\mathbf{RCA5}) = 12105 \text{ g/mol}, M(\mathbf{RCA4}) = 13341 \text{ g/mol}, M(\mathbf{RCA6}) = 31634 \text{ g/mol}$) (Tabelle 15) sowie die Schichtdicke $d = 0.1$ cm und das Gesamtvolumen V des eluierten RCA-Produkts verwendet wurden.

Fluorometrische Quantifizierung Cy3-markierter RCA-Produkte:

Unter Verwendung Cy3-markierter DNA-Primer ($\mathbf{P_{1,Cy3}}, \mathbf{P_{2,Cy3}}$) für die *Rolling Circle Amplification* wurden RCA-Produkte erhalten, die am 5'-Ende eine Cy3-Markierung trugen ($\mathbf{RCA_2}, \mathbf{RCA_5}$). Die Fluoreszenzintensitäten von kurzen Cy3-markierten DNA-Sequenzen ($\mathbf{P_{1,Cy3}}, \mathbf{P_{2,Cy3}}$) wurden am Fluoreszenzspektrometer (*Plate Reader*) gemessen und dienten als Standard um eine Kalibrierkurve (siehe Kapitel 4.4.2.1, Abbildung 25C) zu erstellen (Anregungswellenlänge: $E_{\lambda} = 531$ nm und Emissionswellenlänge: $E_{m\lambda} = 590$ nm). Anschließend wurde die Konzentration Cy3-markierter RCA-Produktstränge ausgehend von der Fluoreszenzintensität der RCA-Produktlösung abgeschätzt.

Messungen der optischen Dichte geben Auskunft über die Konzentration der DNA-Tandemwiederholungen in Lösung. Das Verhältnis der Konzentration der DNA-Tandemwiederholungen zur Konzentration der Cy3-markierten RCA-Stränge führt zur durchschnittlichen Anzahl n an Tandemwiederholungen pro DNA-Strang.

$$n \text{ (Anzahl Wiederholungseinheiten)} = \frac{c(\text{Wiederholungseinheit})}{c(\text{Cy3})} = \frac{A_{260}}{\epsilon_{260} (\text{RCAx})} / c(\text{Cy3})$$

Für den RCA-Strang der Tandemwiederholungen der Länge von 39 Nukleotiden aufweist, konnte damit eine durchschnittliche mittlere Länge von 46 Tandemwiederholungen (1825 nt, mittlere molare Masse ≈ 566000 g/mol) bestimmt werden. Für das DNA-Concatemer welches Tandemwiederholungen der Länge von 50 Nukleotiden aufweist konnte damit eine durchschnittliche mittlere Länge von 15 Tandemwiederholungen (750 nt, mittlere molare Masse ≈ 228000 g/mol) bestimmt werden.

6.2.5.3 Enzymatischer Verdau eines RCA-Concatemers

Die zirkuläre DNA **CP₃** enthält die Nukleobasensequenz AGCT, welche im resultierenden DNA-Concatemer **RCA₄** eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym Alu I kodiert. Der enzymatische Verdau von **RCA₄** wurde nach dem Herstellerprotokoll von *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt. Hierzu wurden 5.8 μL der gereinigten RCA-Reaktionsmischung (0.5 – 1 μg DNA), 11.2 μL nukleasefreies Wasser, 2 μL Tango-Puffer (10x, von *Thermo Fisher Scientific*) und 1 μL (10 U/ μL) Alu I zueinander gegeben, vorsichtig vermischt und für wenige Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Alu I wurde für 20 Minuten bei 65°C thermisch deaktiviert.

6.3 Zusammensetzung der hergestellten Kohlenhydrat-PNA- und Peptid-PNA-DNA-Komplexe

Tabelle 11: Für die Herstellung von mono- und bivalenten PNA-DNA-Komplexen (**T₀₁-T₁₀**) und DNA-Drei-Wege-Kreuzungen (**T₁₁-T₁₆**)^[102] genutzte DNA-Template.

	DNA-Templat (5'→3')	$\epsilon_{260} / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
T ₀₁	GGA ACT ATG ACT GGT TAG CAT AGG CCA GAC ACA GGA GTT	392800
T ₀₂	GGA ACT ATG ACT GGT TAG CAT AGG CCA GCA ACA GGA GTT	391400
T ₀₃	GGA ACT ATG ACT GGT TAG CAT AGG CCA GCA CAA GGA GTT	391400
T ₀₄	GGA ACT ATG ACT GAG CAA CAG GAG TTA GCA ACA GGA GTT	400700
T ₀₅	GGA ACT ATG ACT GAG CAC AAG GAG TTG TTA GCA TAG GCC	391500
T ₀₆	GGA ACT ATG ACT GAG CAA CAG GAG TTG TTA GCA TAG GCC	391500
T ₀₇	GGA ACT ATG ACT GAG ACA CAG GAG TTG TTA GCA TAG GCC	392900
T ₀₈	GTT AGC ATA GGC CGG AAC TAT GAC TGA GCA ACA GGA GTT	391800
T ₀₉	AGC AAC AGG AGT TGG AAC TAT GAC TGG TTA GCA TAG GCC	391800
T ₁₀	GGA ACT ATG ACT GAG CAA CAG GAT AAA AGA GCA TAG GCC	405100
T ₁₁	TCACCGCTC-AA-CTAAACTGG	187100
T ₁₂	CCGAGCGGC-AA-GAGCGGTGA	199400
T ₁₃	CCAGTTTAG-AA-GCCGCTCGG	188300
T ₁₄	TCACCGCTC-AA-CTAAACTGG-CCGGATACGATTGTTGAG-GACAACGAGTTAGCATAGGTC	576700
T ₁₅	CCGAGCGGC-AA-GAGCGGTGA-CCGGATACGATTGTTGAG-GACAACGAGTTAGCATAGGTC	588700
T ₁₆	CCAGTTTAG-AA-GCCGCTCGG-CCGGATACGATTGTTGAG-GACAACGAGTTAGCATAGGTC	577900
T ₁₇	ACTAGCAAAACGACATCTTTATTGAATTATTATCCTACGGCCACTT-CCC	474300

Tabelle 12: Zusammensetzung der in Kapitel 4.2 verwendeten mono- und bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe. Zu den DNA-Templaten (**T₀₁-T₁₀**) wurden die entsprechenden Äquivalente an PNA-Oligomeren (**PNA₁-PNA₆**) gegeben. Um eine Hybridisierung der PNA-Oligomere mit dem DNA-Templat zu gewährleisten wurde auf 75°C erwärmt und innerhalb von 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend lyophilisiert.


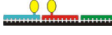











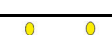
Komplex (3'→5')	Templat	nt	r _{ete} / Å	PNA ₁	PNA ₂	PNA ₃	PNA ₄	PNA ₅	PNA ₆
 NA _m	T ₀₆	-	-	1	1	-	-	-	-
 NA ₂₃	T ₀₁	7	23	1	-	1	-	-	1
 NA ₂₆	T ₀₂	8	26	1	1	1	-	-	-
 NA ₃₃	T ₀₃	10	33	1	-	1	-	1	-
 NA ₄₂	T ₀₄	13	42	1	2	-	-	-	-
 NA ₅₂	T ₀₅	16	52	1	-	1	-	1	-
 NA ₅₉	T ₀₆	18	59	1	1	1	-	-	-
 NA ₆₂	T ₀₇	19	62	1	-	1	-	-	1
 NA ₆₈	T ₀₈	21	68	1	1	1	-	-	-
 NA ₈₅	T ₀₉	26	85	1	1	-	1	-	-
 NA ₁₀₁	T ₀₉	31	101	1	1	1	-	-	-
 NA _{59_6mm}	T ₁₀	18	-	1	1	1	-	-	-
 NA _{68_13bp}	T ₀₈	21	-	-	1	1	-	-	-
 NA _{101_13bp}	T ₀₉	31	-	-	1	1	-	-	-

Tabelle 13: Zusammensetzung der in Kapitel 4.3 verwendeten mono- und bivalenten PeB-PNA-DNA-Komplexe. Zu den DNA-Templaten (**T_x**) wurden die entsprechenden Äquivalente an PEB-modifizierten (**PEB-K₂-PNA1**, **PEB-K₂-PNA2**) und/oder unmodifizierten (**PNA1**, **PNA7**) PNA-Oligomere gegeben. Um eine Hybridisierung der PNA-Oligomere mit dem DNA-Templat zu gewährleisten wurde auf 75°C erwärmt und innerhalb von 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend lyophilisiert.





Komplex (3'→5')	Templat	nt	r _{ete} / Å	PeB-K ₂ -PNA1	PeB-K ₂ -PNA2	PNA1	PNA7
 , monovalent, PeBm	T ₀₆	-	-	-	1	1	1
 , bivalent, PeB26	T ₀₂	8	26	1	1	1	-
 , bivalent, PeB59	T ₀₆	18	59	1	1	1	-
 , bivalent, PeB101	T ₀₉	31	101	1	1	1	-

Tabelle 14: Zusammensetzung der in Kapitel 4.4.1 verwendeten DNA-Drei-Wege-Kreuzungen (**3wj_x**). Um eine Hybridisierung der einzelnen Komponenten zu gewährleisten wurde auf 75°C erwärmt und innerhalb von 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend lyophilisiert.



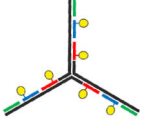


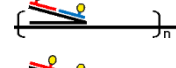
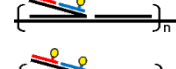


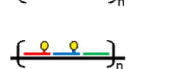
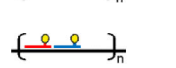


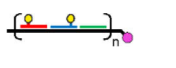
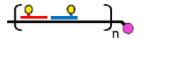



Komplex		DNA- Template		PNA1	PNA2	PNA3
		T ₁₁ /T ₁₂ /T ₁₃	T ₁₄ /T ₁₅ /T ₁₆			
	3wj1	Je 1 Äq.	-	-	-	-
	3wj2	-	Je 1 Äq.	-	-	-
	3wj3	-	Je 1 Äq.	1	1	1

Tabelle 15: PNA- und DNA-Sequenzen zur Herstellung von linearen und verzweigten Komplexen auf DNA-Concatemeren.

PNA	N → C-Terminus	PNA-Länge
PNA1	H-cagtcatagttc-Lys-NH ₂	13
PNA2	H-aactcctgtt(CH ₂ S~Sialyl-LacNAc)gct-Lys-NH ₂	13
PNA3	H-ggcct(CH ₂ S~Sialyl-LacNAc)atgctaac-Lys-NH ₂	13
PNA4	H-ggcctatgct(CH ₂ S~Sialyl-LacNAc)aac-Lys-NH ₂	13
DNA	5' → 3'	DNA-Länge (nt)
AS	AGCAACAGGAGTTGTTAGCATAGGCCTCAATAAAGATGTCGTTTTGCTAGT	51
VS1	GGGAAGTGGCCGTAGGATAAATA	23
VS2	GTGGCCGTAGGATAA	15
RCA _x	5' → 3'	nt/ Tandem
RCA1	TATTTATCCTACGGCACTTCCC(CTAGCAAAACGACATCTTTATTGAATTATT-TATCCTACGGCACTTCCC) _n	50
RCA2	Cy3-TATTTATCCTACGGCACTTCCC-(CTAGCAAAAC-GACATCTTTATTGAATTATTTATCCTACGGCACTTCCC) _n	50
RCA3	CTG-(AGCAACAGGAGTTGTTAGCATAGGCCGGAAGTATGACTG) _n	39
RCA4	(CTGAGCAACAGGAGTTGTTAGCATAGGCCGGAAGTATGAAGCT) _n	43
RCA5	Cy3-CTG-(AGCAACAGGAGTTGTTAGCATAGGCCGGAAGTATGACTG) _n	39
RCA6	(AAAAATGTAGACGCTCGCTG-TAAAAATTCCTCCCTCCTTTAAAAATTCCTGACTGACTCTCCTAACTGACGATGCATAAAAAAAGTTGGCTGGCTGGTGT) _n	103

Tabelle 16: Zusammensetzung der multivalenten PNA-DNA-Komplexe auf langen repetitiven DNA-Templatsträngen. Zum DNA-Templat (**RCAx** oder **T17**) wurden die angegebenen Äquivalente an PNA-Oligomeren (**PNA1** – **PNA4**), für verzweigte Komplexe auch DNA-Adapterstränge **AS** und DNA-Versteiferstränge **VS**, hinzugefügt. Konzentrationen der Stammlösungen: $c(\text{PNA}) \approx 100 \mu\text{M}$, $c(\text{RCA}_x) \approx 4 \mu\text{M}$, $c(\text{AS}) = c(\text{VS}) = 100 \mu\text{M}$. Die Mischung wurde auf 75°C erhitzt, geschüttelt und zur Hybridisierung innerhalb von 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend lyophilisiert.

Komplex	Templat	PNA2	PNA3	PNA1	PNA4	AS	VS1	VS2
 BX000	RCA1	1	1	-	-	1	1	-
 BX000-2	RCA1	1	1	-	-	1	-	1
 BX000-3	RCA1	1	1	-	-	1	-	-
 B4000-42A	RCA1	-	1	-	1	1	1	-
 B4000-3-42A	RCA1	-	1	-	1	1	-	-
 LXX00	RCA3	1	1	1	-	-	-	-
 LXX00-2	RCA3	1	1	-	-	-	-	-
 L8700-42A	RCA3	-	1	1	1	-	-	-
 L8700-2-42A	RCA3	-	1	-	1	-	-	-
 B3000-Cy3	RCA2	1	1	-	-	1	1	-
 B3000-3-Cy3	RCA2	1	1	-	-	1	-	-
 L6500-Cy3	RCA5	1	1	1	-	-	-	-
 L6500-2-Cy3	RCA5	1	1	-	-	-	-	-
- CXXXX	RCA6	1	1	1	-	-	-	-
 NA59-C1	T17	1	1	-	-	1	1	-
 NA59-C2	T17	1	1	-	-	1	-	-

6.4 Hämagglutinationstest und Mikroskalige Thermophorese

Allgemeines zum Hämagglutinationstest:

Diese Messungen wurden von Daniel Lauster und Malte Hilsch (beide *AG Herrmann*, HU Berlin) durchgeführt. Genauere Angaben zu den verwendeten Influenzastämmen und der Viruspräparation sind den angehängten Informationen von *Seitz et al.*^[104, 143] zu entnehmen. Das antivirale Potential der Sialyl-LacNAc-PNA·DNA-Komplexe wurde mithilfe eines Hämagglutinationstests ermittelt. Auf einer Mikrotiterplatte mit 96-Kavitäten wurden die Verbindungen zunächst mit einem PBS-Puffer in einer seriellen Verdünnung jeweils um den Faktor zwei verdünnt, mit 2 hämagglutinierenden Viruseinheiten (HAU) präinkubiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. 2 HAU entsprechen nach literaturbekannten Angaben einer Anzahl von $2 \cdot 10^7$ Viruspartikeln.^[152] Im Anschluss wurden 50 μL einer 1%-igen humanen Erythrozytenlösung ($\approx 2 \cdot 10^6$ Zellen/ μL) zu jeder Kavität hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inhibitionskonstante (K_i^{HAU}) gibt die minimale Inhibitorverdünnung an, bei der noch eine Inhibition der Hämagglutination auftritt, was sich durch die Ausbildung eines definierten Blutaggregats am Boden der Kavität sichtbar macht. Im Rahmen des Hämagglutinationstests wurden für bivalente PNA·DNA-Komplexe zunächst 2 nmol pro Komplex getestet. Dies führt in einem Volumen von 10 μL zu einer initialen Konzentration von 200 μM . Nach 11 Verdünnungen ergibt sich die kleinste getestete Konzentration aus $200 \mu\text{M} / 2^{11} \approx 0.098 \mu\text{M}$.

Bei Verwendung der RCA-Template wurden zur Herstellung der seriellen Verdünnungsreihe typischerweise 1 pmol pro Komplex (228 ng für RCA-Produkte mit der molekularen Masse von $M = 228000 \text{ g/mol}$ und 566 ng für RCA-Produkte mit $M = 566000 \text{ g/mol}$) verwendet. Dies ergibt in einem Volumen von 10 μL eine initiale Konzentration von 100 nM, was nach 11 Verdünnungen zu einer Konzentration von 0.05 nM führt. Die Konzentrationsspanne bezogen auf die Glykoliganden kann in Abhängigkeit der Glykobeladung angegeben werden. Beispielsweise, wurden bei 1 pmol des Komplexes **B3000** (Beladung: 3000 pmol SLN pro μg RCA-Produkt; $m(\text{RCA1}) = 228 \text{ mg}$) etwa 342 pmol **PNA1** und 342 pmol **PNA2** verwendet. Demzufolge beträgt die initiale Konzentration von SLN 68 μM und nach 11 Verdünnung beträgt die geringste getestete Glykokonzentration 0.03 μM .

Allgemeines zur mikroskaligen Thermophorese (MST):

Die MST-Messungen wurden von Daniel Lauster (*AG Herrmann*, HU Berlin) an einem Gerät des Typs *Monolith NT. 115* von *Nanotemper* durchgeführt. Jeder Inhibitor wurden zunächst seriell zweifach verdünnt und mit gleichen Mengen an R18-markiertem X-31 Virus (4 HAU, $c_{\text{final}} \approx 0.1 \text{ nM}$

Viruspartikel) oder mit 20 nM Alexa647-markiertem bHA vermischt. Nach kurzer Inkubationszeit wurden diese Mischungen mit Glaskapillaren (Standard) aufgenommen und jeweils deren initiale Fluoreszenz sowie die Veränderung der Fluoreszenz im Verlauf der Thermophoresemessung aufgenommen. Weiterführende experimentelle Angaben finden sich bei *Seitz et al.*^[104]

Tabelle 17: Vergleich rigider (NA59, NA68, NA101) und flexiblerer (NA59_6mm, NA68_13bp, NA101_13bp) bivalenter Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Komplexe im Hämagglutinationstest und mikroskaliger Thermophorese (Kapitel 4.2.5).







Komplex	$K_r^{HAI, DNA} (X31) / \mu M$	$K_{D,app} (X31) / \mu M$
 NA59	44±6	16±2
 NA59_6mm	31	14±4
 NA68	78±18	136±21
 NA68_13bp	35±9	52±9
 NA101	>500	340±42
 NA101_13bp	51±22	78±13

Tabelle 18: MST-Messungen mit monovalenten und bivalenten PeB-PNA-DNA-Duplexen im Vergleich mit monovalenten und bivalenten Sialyl-LacNAc-PNA-DNA-Duplexen. Gezeigt sind die $K_{D,app}$ -Werte aus Messungen mit fluoreszenzmarkiertem bHA (Kapitel 4.3).







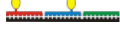



	$r_{ete} / \text{\AA}$	$K_{D,app} / \mu M (bHA)$
$\alpha 2,6\text{-SLN } 17$	monovalent	3100±250
PeB-K ₂	monovalent	1200±300
 PeBm	monovalent	220±40
 PeB26	26	200±13
 PeB59	59	86±5
 PeB101	101	250±12
 NAm	monovalent	863±67
 NA26	26	208±18
 NA59	59	104±11
 NA101	101	588±47

Tabelle 19: Kontrollexperimente zur Inhibition der viralen Hämagglutination mit Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten hybridisiert auf DNA-Templaten mit überhängender DNA (**NA59-C1**, **NA59-C2**) und Mischungen aus Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten mit nicht-komplementären DNA-Concatemeren (**CXXXX**) (Kapitel 4.4.2.3).

	SLN/RCA in pmol/μg	$K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN})/\mu\text{M}$ (X31)	$K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA})/\text{ng}^{[\text{a}]}$ (X31)
 NA59-C1	-	>200	-
 NA59-C2	-	>200	-
RCA6	-	-	>1370
C1300	1300	>175	>1370
C1800	1800	>250	>1370
C2700	2700	>372	>1370

$K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN})$, beziehungsweise $K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA}) > x$ bedeutet, dass keine virale Hämagglutination bei einer Ligandenkonzentration, beziehungsweise Masse an DNA-Templat, $\leq x$ erzielt wurde. [a] K_i^{HAI} wurde auf die Masse des DNA-Templats bezogen.

Tabelle 20: Inhibition der Hämagglutination verschiedener viraler Stämme des antigenen Typs A durch monovalente Sialyllactose (SL) und multivalenter Komplexe nach linearer und verzweigter Hybridisierung von Sialyl-LacNAc-PNA-Konjugaten auf DNA-Concatemeren (siehe Kapitel 4.4.2.3).

	$K_i^{\text{HAI}}(\text{SL})/\mu\text{M}^{[104]}$	$K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN, B3000-Cy3})/\mu\text{M}$	$K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN, B3000-3-Cy3})/\mu\text{M}$	$K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN, L6500-Cy3})/\mu\text{M}$	$K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN, L6500-2-Cy3})/\mu\text{M}$
A/ Aichi/ 1968/ H3N2(X31)	50000	50	19±6	70±23	30±17
A/ Panama/ 1999/ H3N2	50000	100	38±13	279±93	70±23
A/ Puerto Rico/ 8/ 1934/ H1N1	50000	>500	>200	>500	70±23
		$K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA, B3000-Cy3})/\text{nM}$	$K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA, B3000-3-Cy3})/\text{nM}$	$K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA, L6500-Cy3})/\text{nM}$	$K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA, L6500-2-Cy3})/\text{nM}$
A/ Aichi/ 1968/ H3N2(X31)		74	28±9	20±7	9±5
A/ Panama/ 1999/ H3N2		147	56±19	82±27	20±7
A/ Puerto Rico/ 8/ 1934/ H1N1		>735	>294	>146	20±7

$K_i^{\text{HAI}}(\text{SLN})$ ($K_i^{\text{HAI}}(\text{RCA})$) $> x$ bedeutet, dass keine Inhibition der viralen Hämagglutination erreicht wurde bei einer Ligandenkonzentration (oder Konzentration des Cy3-markierten RCA-Produktes) $\leq x$. Für Werte ohne Fehler wurde die Inhibition der viralen Hämagglutination wiederholt bei identischen Inhibitorkonzentrationen erreicht.

6.5 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Kai Ludwig (AG Böttcher, FU Berlin) angefertigt. Detailliertere Ausführungen zur Probenpräparation und Messungen wurden bei Seitz et al.^[104, 143] beschrieben.

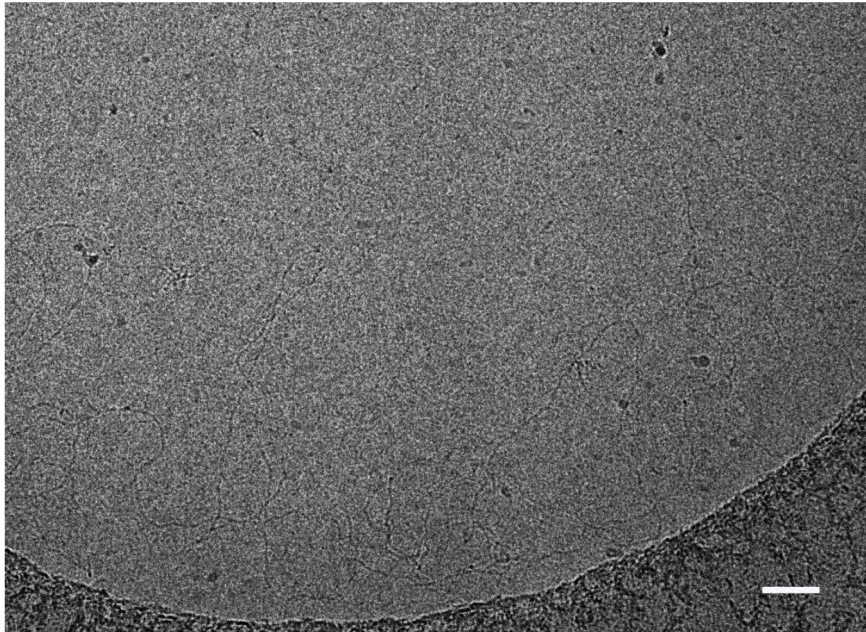


Abbildung 66: Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahme von **RCA3** in PBS-Puffer eingebettet in vitrifiziertem Eis (pH 7.4, $c_{\text{final}} \approx 500 \text{ ng}/\mu\text{L}$ RCA-Produkt; Maßstab: 50 nm).

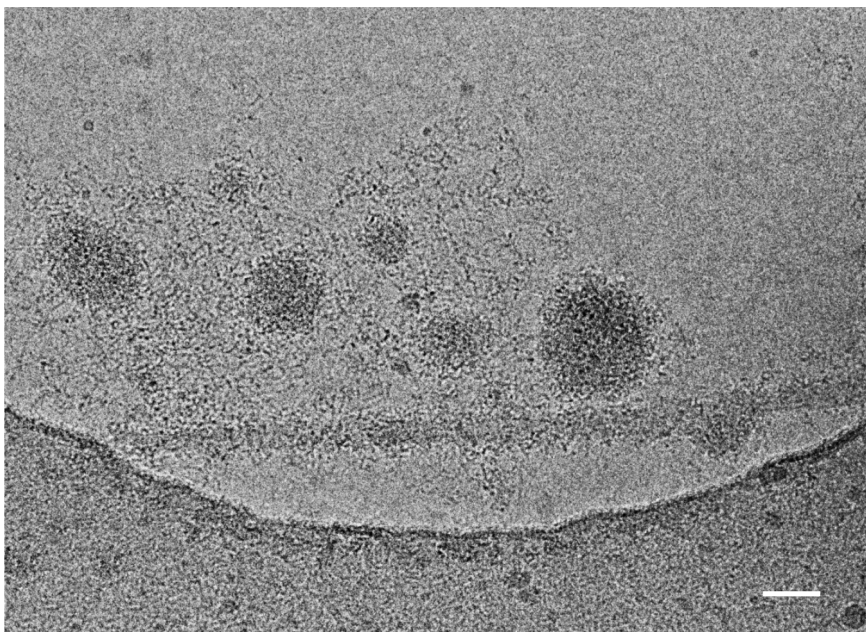


Abbildung 67: Morphologie des Komplexes **L6500-2-Cy3** in PBS-Puffer (pH 7.5) eingebettet in vitrifiziertem Eis ($c_{\text{final}} \approx 17 \text{ ng}/\mu\text{L}$ RCA-Produkt; c_{final} : 110 pmol/ μL Trisaccharid; Maßstab: 50 nm).

7. Literaturverzeichnis

- [1] P. R. Crocker, J. C. Paulson, A. Varki, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, 7, 255-266.
- [2] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
- [3] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2755-2794.
- [4] S. Chipowsky, Y. C. Lee, S. Roseman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, 70, 2309-2312.
- [5] M. J. Krantz, N. A. Holtzman, C. P. Stowell, Y. C. Lee, *Biochemistry* **1976**, 15, 3963-3968.
- [6] P. H. Weigel, E. Schmell, Y. C. Lee, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 330-333.
- [7] C. L. Yuan, *Carbohydr. Res.* **1978**, 67, 509-514.
- [8] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2348-2368.
- [9] V. Wittmann, R. J. Pieters, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4492-4503.
- [10] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Darnedde, C. Graf, E. W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10472-10498.
- [11] C. Muller, G. Despras, T. K. Lindhorst, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 3275-3302.
- [12] S. Bhatia, L. Cuellar, R. Haag, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 8654-8666.
- [13] N. Jayaraman, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3463-3483.
- [14] N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2010**, 10, 1971-1978.
- [15] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 65-87.
- [16] C. Scheibe, S. Wedepohl, S. B. Riese, J. Darnedde, O. Seitz, *ChemBioChem* **2013**, 14, 236-250.
- [17] F. Abendroth, A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8592-8596.
- [18] E. A. Englund, D. Y. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell, D. H. Appella, *Nat. Commun.* **2012**, 3, 614-620.
- [19] K. Matsuura, M. Hibino, Y. Yamada, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 357-358.
- [20] T. Machida, A. Novoa, E. Gillon, S. S. Zheng, J. Claudinon, T. Eierhoff, A. Imberty, W. Romer, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 6762-6766.
- [21] K. Gorska, K. T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7695-7700.
- [22] C. Scheibe, A. Bujotzek, J. Darnedde, M. Weber, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 770-775.
- [23] H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 4146-4150.
- [24] F. Diezmann, L. von Kleist, V. Haucke, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 8008-8015.
- [25] J. M. Paar, N. T. Harris, D. Holowka, B. Baird, *J. Immunol.* **2002**, 169, 856-864.
- [26] S. Rinker, Y. Ke, Y. Liu, R. Chhabra, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 418-422.

-
- [27] B. A. Williams, C. W. Diehnelt, P. Belcher, M. Greving, N. W. Woodbury, S. A. Johnston, J. C. Chaput, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17233-17241.
- [28] K. Gorska, J. Beyrath, S. Fournel, G. Guichard, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7742-7744.
- [29] B. M. G. Janssen, E. H. M. Lempens, L. L. C. Olijve, I. K. Voets, J. L. J. van Dongen, T. F. A. de Greef, M. Merckx, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1442-1450.
- [30] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
- [31] R. H. Kramer, J. W. Karpen, *Nature* **1998**, *395*, 710-713.
- [32] S. Liese, R. R. Netz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 804-816.
- [33] N. Dubel, S. Liese, F. Scherz, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 907-911.
- [34] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179-4190.
- [35] I. Papp, C. Sieben, A. L. Sisson, J. Kostka, C. Böttcher, K. Ludwig, A. Herrmann, R. Haag, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 887-895.
- [36] J. Vonnemann, S. Liese, C. Kuehne, K. Ludwig, J. Dervede, C. Bottcher, R. R. Netz, R. Haag, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2572-2579.
- [37] T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256-28263.
- [38] V. Wittmann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 982-989.
- [39] F. Pertici, R. J. Pieters, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4008-4010.
- [40] F. Pertici, N. J. de Mol, J. Kemmink, R. J. Pieters, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16923-16927.
- [41] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Möller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704-8719.
- [42] B. Patrick, N. Bettina, W. Valentin, D. Malte, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8428-8431.
- [43] M. Hussain, H. D. Galvin, T. Y. Haw, A. N. Nutsford, M. Husain, *Infect. Drug Resist.* **2017**, *10*, 121-134.
- [44] L. G. Baum, J. C. Paulson, *Acta Histochem. Suppl.* **1990**, *40*, 35-38.
- [45] B. Dadonaite, S. Vijayakrishnan, E. Fodor, D. Bhella, E. C. Hutchinson, *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 1755-1764.
- [46] M. D. Badham, J. S. Rossman, *Curr. Clin. Micro. Rpt.* **2016**, *3*, 155-161.
- [47] A. Harris, G. Cardone, D. C. Winkler, J. B. Heymann, M. Brecher, J. M. White, A. C. Steven, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 19123-19127.
- [48] L. H. Pinto, L. J. Holsinger, R. A. Lamb, *Cell* **1992**, *69*, 517-528.
- [49] M. Marsh, A. Helenius, *Adv. Virus Res.* **1989**, *36*, 107-151.
- [50] S. Li, C. Sieben, K. Ludwig, C. T. Hofer, S. Chiantia, A. Herrmann, F. Eghiaian, I. A. Schaap, *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1447-1456.

-
- [51] S. Boulo, H. Akarsu, R. W. Ruigrok, F. Baudin, *Virus Res.* **2007**, *124*, 12-21.
- [52] G. M. Air, *Influenza Other Respir. Viruses* **2012**, *6*, 245-256.
- [53] J. K. Taubenberger, D. M. Morens, *Annu. Rev. Pathol.* **2008**, *3*, 499-522.
- [54] P. R. Saunders-Hastings, D. Krewski, *Pathogens* **2016**, *5*, 66.
- [55] W. P. Glezen, *Epidemiol. Rev.* **1996**, *18*, 64-76.
- [56] S. I. van de Wakker, M. J. E. Fischer, R. S. Oosting, *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *809*, 178-190.
- [57] X. Wu, X. Wu, Q. Sun, C. Zhang, S. Yang, L. Li, Z. Jia, *Theranostics* **2017**, *7*, 826-845.
- [58] A. Moscona, *Annu. Rev. Med.* **2008**, *59*, 397-413.
- [59] P. Schirmer, M. Holodniy, *Expert Opin. Drug Saf.* **2009**, *8*, 357-371.
- [60] N. C. Wu, I. A. Wilson, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 115-121.
- [61] N. K. Sauter, M. D. Bednarski, B. A. Wurzburg, J. E. Hanson, G. M. Whitesides, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8388-8396.
- [62] P. L. Toogood, P. K. Galliker, G. D. Glick, J. R. Knowles, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3138-3140.
- [63] E. G. Weinhold, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9270-9275.
- [64] M. Rajik, A. R. Omar, A. Ideris, S. S. Hassan, K. Yusoff, *Int. J. Biol. Sci.* **2009**, *5*, 543-548.
- [65] H. Memczak, D. Lauster, P. Kar, S. Di Lella, R. Volkmer, V. Knecht, A. Herrmann, E. Ehrentreich-Förster, F. F. Bier, W. F. M. Stöcklein, *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0159074.
- [66] S. H. Jeon, B. Kayhan, T. Ben-Yedidia, R. Arnon, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48410-48419.
- [67] S. C. Gopinath, T. S. Misono, K. Kawasaki, T. Mizuno, M. Imai, T. Odagiri, P. K. Kumar, *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 479-487.
- [68] D. Corti, E. Cameroni, B. Guarino, N. L. Kallewaard, Q. Zhu, A. Lanzavecchia, *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *24*, 60-69.
- [69] N. L. Kallewaard, D. Corti, P. J. Collins, U. Neu, J. M. McAuliffe, E. Benjamin, L. Wachter-Rosati, F. J. Palmer-Hill, A. Q. Yuan, P. A. Walker, M. K. Vorlaender, S. Bianchi, B. Guarino, A. De Marco, F. Vanzetta, G. Agatic, M. Foglierini, D. Pinna, B. Fernandez-Rodriguez, A. Fruehwirth, C. Silacci, R. W. Odrodowicz, S. R. Martin, F. Sallusto, J. A. Suzich, A. Lanzavecchia, Q. Zhu, S. J. Gamblin, J. J. Skehel, *Cell* **2016**, *166*, 596-608.
- [70] X. Zhidao, T. T. James, *Biomed. Mater.* **2006**, *1*, R1-9.
- [71] J. M. Anderson, A. Rodriguez, D. T. Chang, *Semin. Immunol.* **2008**, *20*, 86-100.
- [72] W. J. Lees, A. Spaltenstein, J. E. Kingerywood, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3419-3433.
- [73] A. S. Gambaryan, A. B. Tuzikov, A. A. Chinarev, L. R. Juneja, N. V. Bovin, M. N. Matrosovich, *Antivir. Res.* **2002**, *55*, 201-205.
- [74] K. Totani, T. Kubota, T. Kuroda, T. Murata, K. I. P. J. Hidari, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Kobayashi, H. Ashida, K. Yamamoto, T. Usui, *Glycobiology* **2003**, *13*, 315-326.

- [75] H. Wang, W. Huang, J. Orwenyo, A. Banerjee, G. R. Vasta, L. X. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2037-2044.
- [76] M. Umemura, M. Itoh, Y. Makimura, K. Yamazaki, M. Umekawa, A. Masui, Y. Matahira, M. Shibata, H. Ashida, K. Yamamoto, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4496-4503.
- [77] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789–3800.
- [78] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103-4111.
- [79] Z. Zhang, B. Schepens, L. Nuhn, X. Saelens, M. Schotsaert, N. Callewaert, R. De Rycke, Q. Zhang, S. Moins, S. Benali, L. Mespouille, R. Hoogenboom, B. G. De Geest, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3352-3355.
- [80] R. Weissleder, K. Kelly, E. Y. Sun, T. Shtatland, L. Josephson, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1418-1423.
- [81] I. Papp, C. Sieben, K. Ludwig, M. Roskamp, C. Bottcher, S. Schlecht, A. Herrmann, R. Haag, *Small* **2010**, *6*, 2900-2906.
- [82] J. Vonnemann, C. Sieben, C. Wolff, K. Ludwig, C. Bottcher, A. Herrmann, R. Haag, *Nanoscale* **2014**, *6*, 2353-2360.
- [83] D. Lauster, S. Klenk, K. Ludwig, S. Nojoudi, S. Behren, L. Adam, M. Stadtmüller, S. Saenger, S. Zimmer, K. Hönzke, L. Yao, U. Hoffmann, M. Bardua, A. Hamann, M. Witzernath, L. E. Sander, T. Wolff, A. C. Hocke, S. Hippenstiel, S. De Carlo, J. Neudecker, K. Osterrieder, N. Budisa, R. R. Netz, C. Böttcher, S. Liese, A. Herrmann, C. P. R. Hackenberger, *Nat. Nanotechnol.* **2020**.
- [84] S. J. Kwon, D. H. Na, J. H. Kwak, M. Douaisi, F. Zhang, E. J. Park, J. H. Park, H. Youn, C. S. Song, R. S. Kane, J. S. Dordick, K. B. Lee, R. J. Linhardt, *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 48–54.
- [85] J. J. Landers, Z. Y. Cao, I. Lee, L. T. Piehler, P. P. Myc, A. Myc, T. Hamouda, A. T. Galecki, J. R. Baker, *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1222-1230.
- [86] R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1869-1872
- [87] M. Waldmann, R. Jirrmann, K. Hoelscher, M. Wienke, F. C. Niemeyer, D. Rehders, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 783-788.
- [88] G. D. Glick, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4701-4703.
- [89] H. G. Hansma, K. J. Kim, D. E. Laney, R. A. Garcia, M. Argaman, M. J. Allen, S. M. Parsons, *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 99-108.
- [90] Y. Lu, B. Weers, N. C. Stellwagen, *Biopolymers* **2001**, *61*, 261-275.
- [91] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 410-413.
- [92] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566.

-
- [93] A. Novoa, N. Winssinger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 707-719.
- [94] C. Scheibe, O. Seitz, *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 77-85.
- [95] T. Akasaka, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 776-785.
- [96] K. Matsuura, M. Hibino, T. Ikeda, Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 352-359.
- [97] Y. Yamada, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1913-1922.
- [98] N. K. Sauter, G. D. Glick, R. L. Crowther, S. J. Park, M. B. Eisen, J. J. Skehel, J. R. Knowles, D. C. Wiley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 324-328.
- [99] N. Silva-Martin, S. G. Bartual, E. Ramirez-Aportela, P. Chacon, C. G. Park, J. A. Hermoso, *Structure* **2014**, *22*, 1595-1606.
- [100] D. D. Singh, K. Saikrishnan, P. Kumar, A. Surolia, K. Sekar, M. Vijayan, *Glycobiology* **2005**, *15*, 1025-1032.
- [101] A. M. Riley, A. J. Laude, C. W. Taylor, B. V. L. Potter, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 278-289.
- [102] M. Matsui, Y. Ebara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6139-6143.
- [103] M. Yamabe, K. Kaihatsu, Y. Ebara, *Bioconjug. Chem.* **2018**, 1490-1494.
- [104] V. Bandlow, S. Liese, D. Lauster, K. Ludwig, R. R. Netz, A. Herrmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16389-16397.
- [105] W. J. Lees, A. Spaltenstein, J. E. Kingerywood, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3419-3433.
- [106] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103-4111.
- [107] S. Tang, W. B. Puryear, B. M. Seifried, X. Dong, J. A. Runstadler, K. Ribbeck, B. D. Olsen, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 413-418.
- [108] D. C. Wiley, J. J. Skehel, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 365-394.
- [109] W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1988**, *333*, 426-431.
- [110] R. T. Lee, Y. Shinohara, Y. Hasegawa, Y. C. Lee, *Biosci. Rep.* **1999**, *19*, 283-292.
- [111] M. L. Joseph, S. T. Jon, *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59-81.
- [112] U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, *280*, 251-260.
- [113] A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.* **1991**, *209*, C1-C4.
- [114] K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, N. J. Bockovich, C. H. Wong, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 870-872.
- [115] E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5365-5422.
- [116] C. Scheibe, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I **2012**.
- [117] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- [118] V. Wittmann, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144-2147.

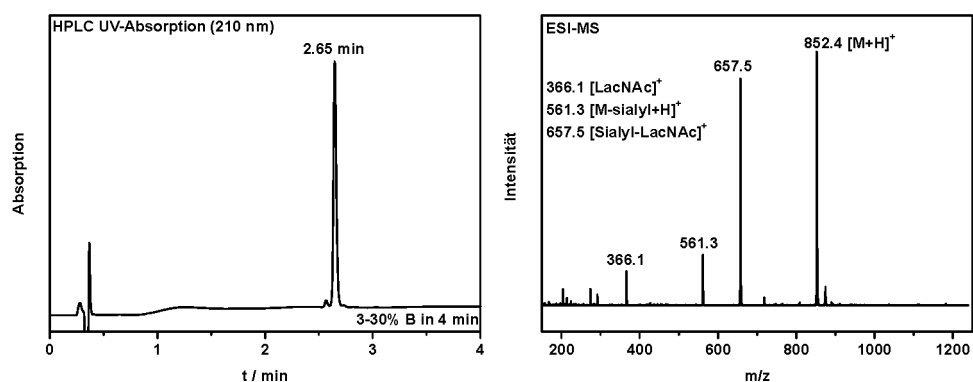
- [119] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308-9309.
- [120] B. S. Khatra, D. G. Herries, K. Brew, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *44*, 537-560.
- [121] W. D. Klohs, R. J. Bernacki, W. Korytnyk, *Cancer Res.* **1979**, *39*, 1231-1238.
- [122] L. D. Cambron, K. C. Leskawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *193*, 585-590.
- [123] F. Filira, L. Biondi, M. Gobbo, R. Rocchi, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7463-7464.
- [124] H. Y. Song, M. H. Ngai, Z. Y. Song, P. A. MacAry, J. Hobley, M. J. Lear, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3400-3406.
- [125] J. V. Staros, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 435-441.
- [126] R. Casale, I. S. Jensen, M. Egholm, in *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, 1. Auflage (Herausgeber: P. E. Nielsen, M. Egholm)*, Horizon Scientific Press, Wymondham, **1999**, S. 39-50.
- [127] P. E. Nielsen, G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1939-1942.
- [128] E. Protozanova, P. Yakovchuk, M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 775-785.
- [129] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767-5773.
- [130] K. Devanand, J. C. Selser, *Macromolecules* **1991**, *24*, 5943-5947.
- [131] S. Liese, M. Gensler, S. Krysiak, R. Schwarzl, A. Achazi, B. Paulus, T. Hugel, J. P. Rabe, R. R. Netz, *ACS Nano* **2017**, *11*, 702-712.
- [132] X. L. Xiong, P. J. Coombs, S. R. Martin, J. F. Liu, H. X. Xiao, J. W. McCauley, K. Locher, P. A. Walker, P. J. Collins, Y. Kawaoka, J. J. Skehel, S. J. Gamblin, *Nature* **2013**, *497*, 392-396.
- [133] C. M. Brand, J. J. Skehel, *Nat. New Biol.* **1972**, *238*, 145-147.
- [134] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus, *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102*, 3586-3616.
- [135] S. D. Black, D. R. Mould, *Anal. Biochem.* **1991**, *193*, 72-82.
- [136] M. N. Janakiraman, C. L. White, W. G. Laver, G. M. Air, M. Luo, *Biochemistry* **1994**, *33*, 8172-8179.
- [137] T. Reddy, D. Shorthouse, D. L. Parton, E. Jefferys, P. W. Fowler, M. Chavent, M. Baaden, M. S. P. Sansom, *Structure* **2015**, *23*, 584-597.
- [138] D. Lauster, M. Glanz, M. Bardua, K. Ludwig, M. Hellmund, U. Hoffmann, A. Hamann, C. Bottcher, R. Haag, C. P. R. Hackenberger, A. Herrmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5931-5936.
- [139] D. Lauster, Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät **2018**.
- [140] M. Marczyneke, K. Groger, O. Seitz, *Bioconj. Chem.* **2017**, *28*, 2384-2392.

- [141] W. Zhao, M. M. Ali, M. A. Brook, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6330-6337.
- [142] Q. Chi, G. Wang, J. Jiang, *Physica A* **2013**, *392*, 1072-1079.
- [143] V. Bandlow, D. Lauster, K. Ludwig, M. Hilsch, V. Reiter-Scherer, J. P. Rabe, C. Böttcher, A. Herrmann, O. Seitz, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 159-165.
- [144] S. Sabesan, J. Duus, P. Dommelle, S. Kelm, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5865-5866.
- [145] A. Marra, L. Moni, D. Pazzi, A. Corallini, D. Bridi, A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1396-1409.
- [146] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767-5773.
- [147] D. H. Rich, P. D. Gesellchen, A. Tong, A. Cheung, C. K. Buckner, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1004-1010.
- [148] O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta.* **1975**, *58*, 531-541.
- [149] A. K. Barman, S. Verma, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6992-6994.
- [150] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.
- [151] Q. Sun, W. Chen, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6701-6704.
- [152] U. Desselberger, *Arch. Virol.* **1975**, *49*, 365-372.

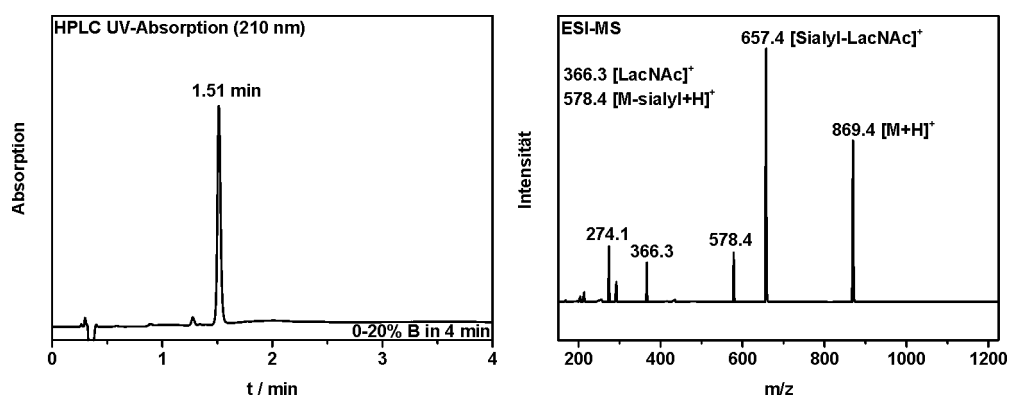
8. Anhang

8.1 UPLC-Chromatogramme und ESI-MS-Spektren

N-Cbz-aminoethyl-sialyl-LacNAc **17**:



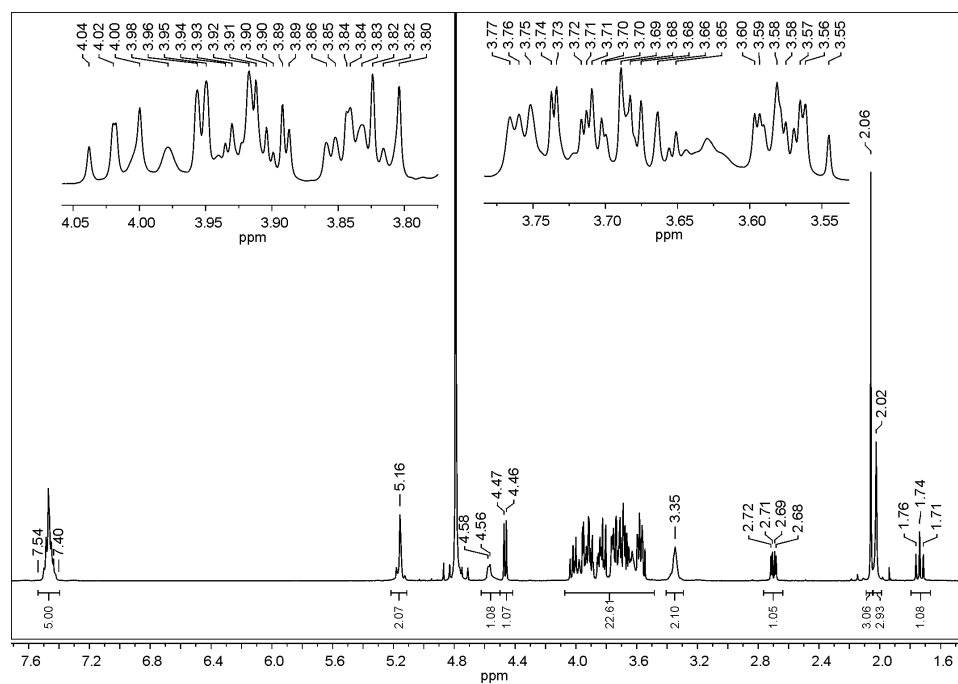
Maleimido-Sialyl-LacNAc **18**:



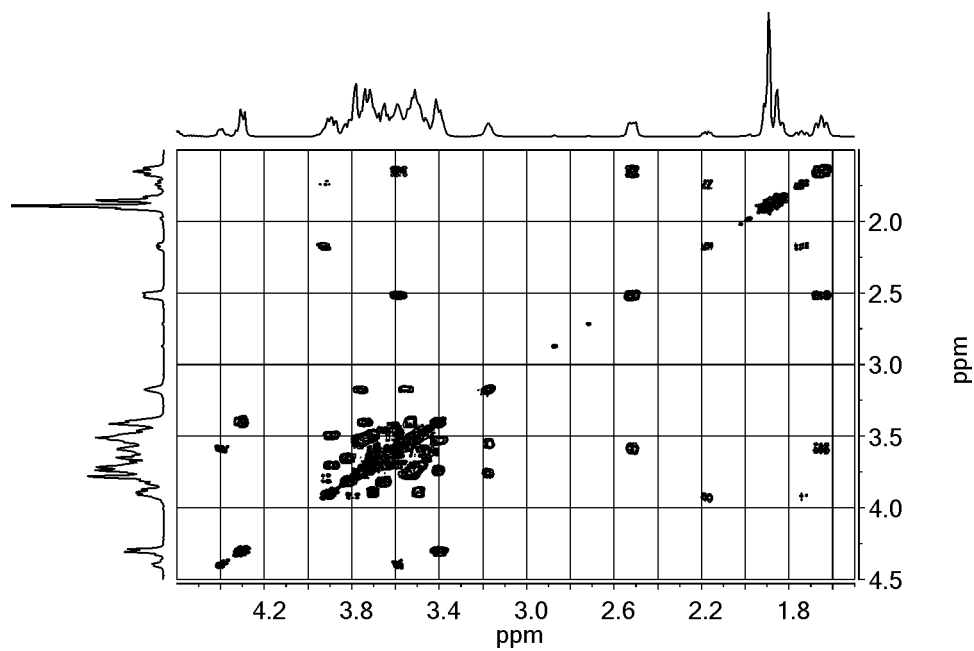
8.2 NMR-Spektren

N-Cbz-aminoethyl-Sialyl-LacNAc **17**

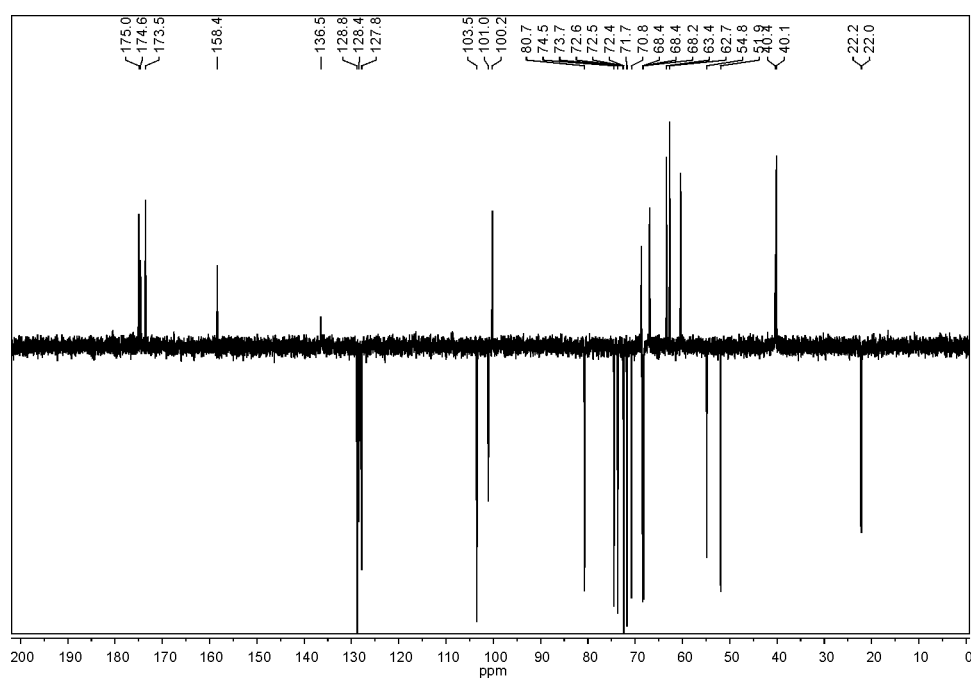
^1H -NMR (500 MHz, D_2O):



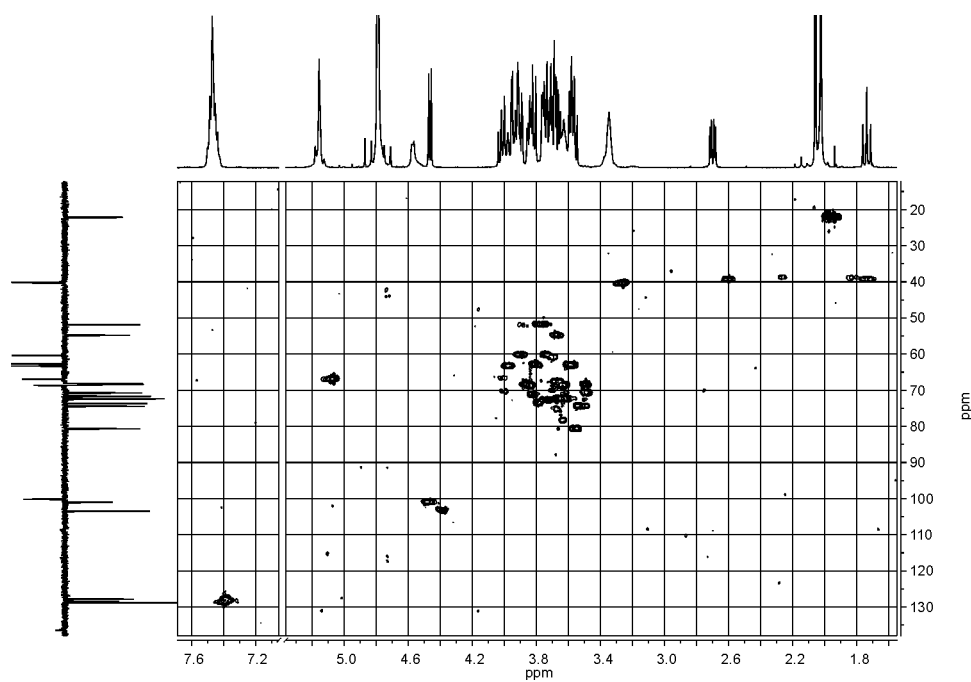
^1H - ^1H -COSY (500 MHz, D_2O):

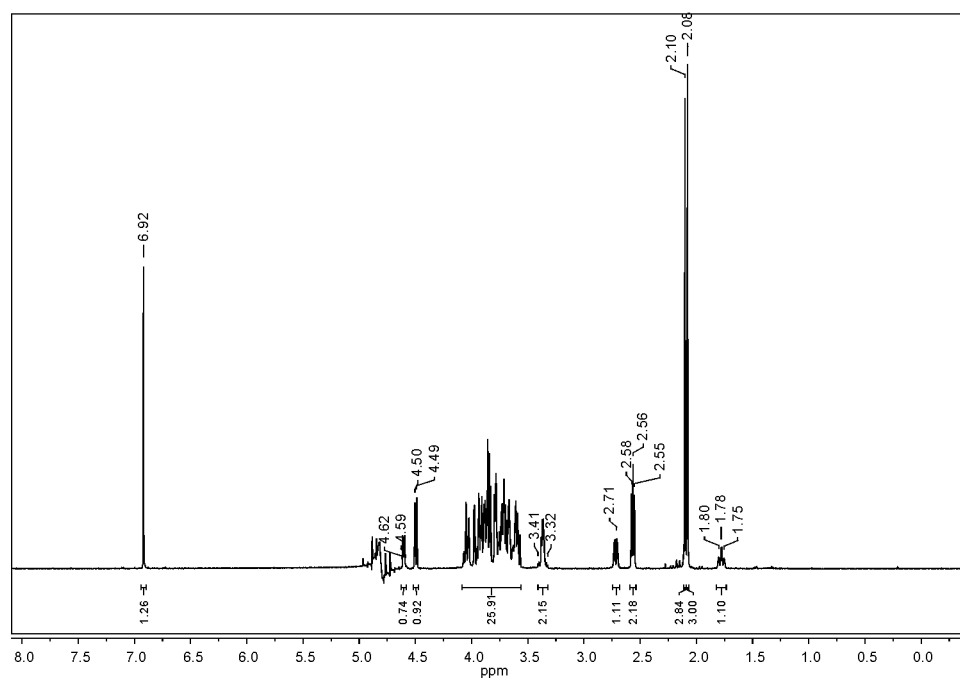
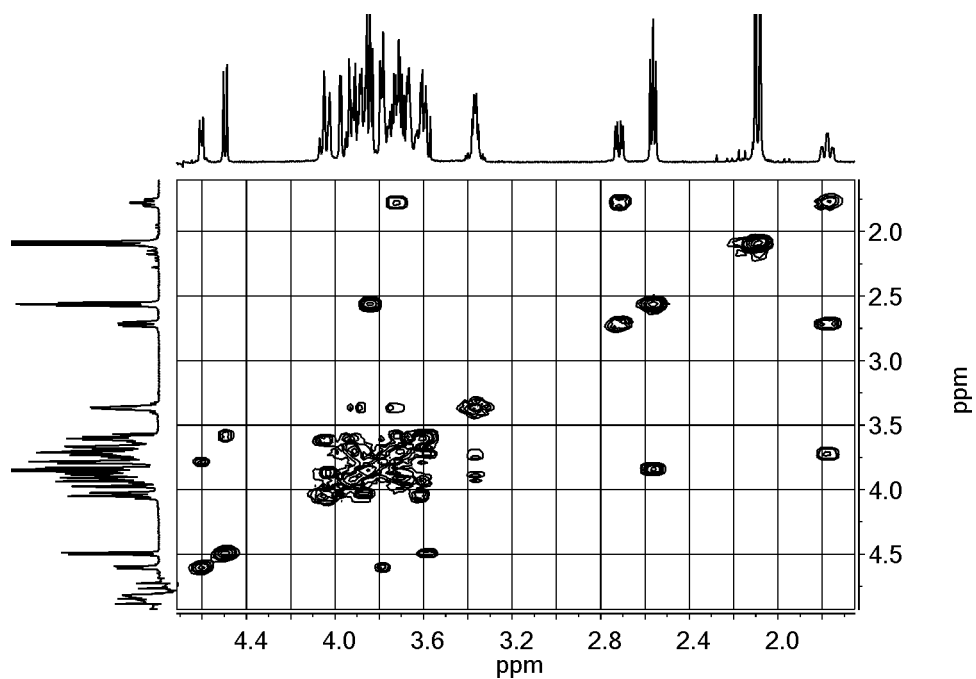


^{13}C -APT-NMR (125 MHz, H_2O):



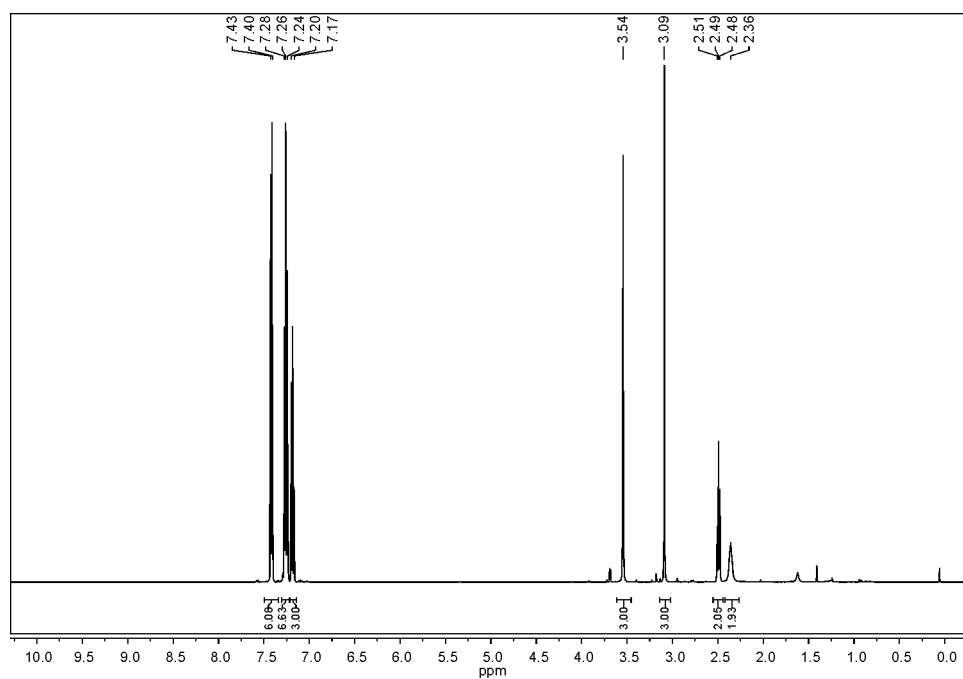
HSQC (500/ 126 MHz, DMSO-d_6):



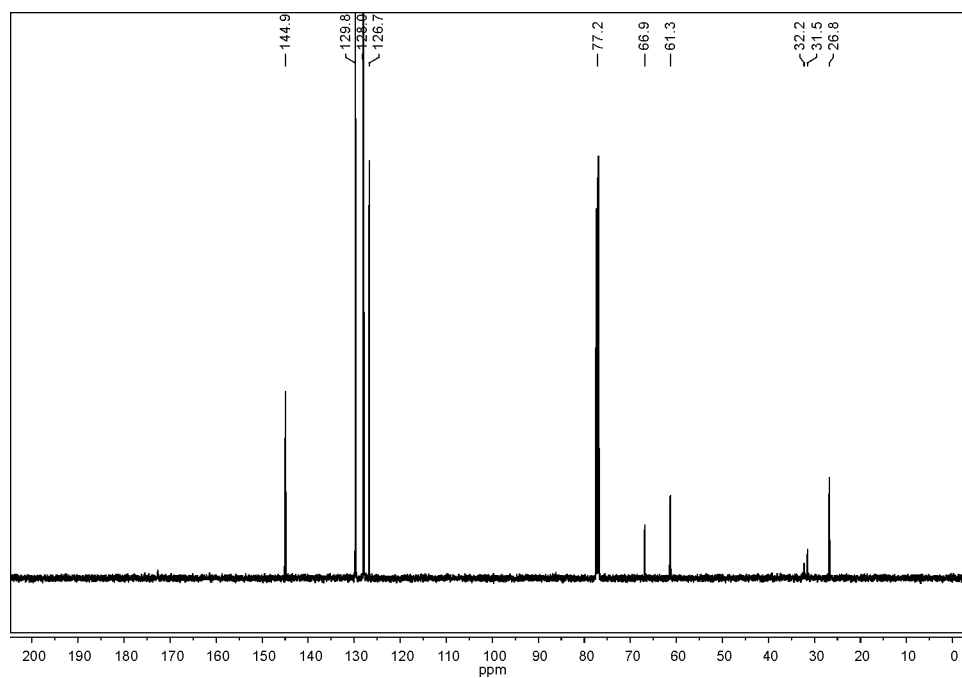
Maleimido-Sialyl-LacNAc **18** ^1H -NMR (500 MHz, D_2O , presat) ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, D_2O , presat):

3-(Tritylthio)propionsäure-Weinrebamid (**26**)

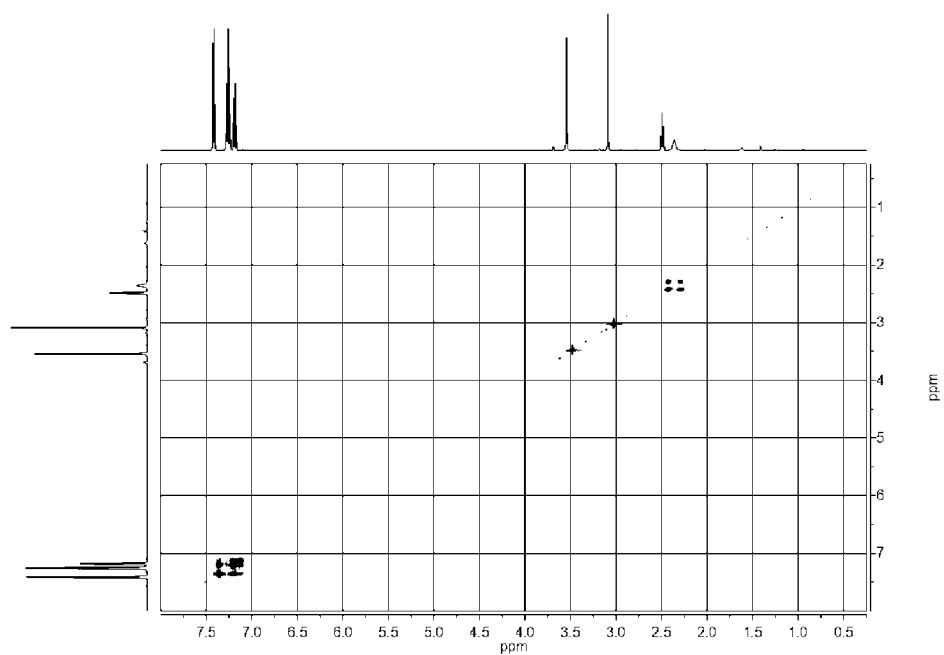
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3)



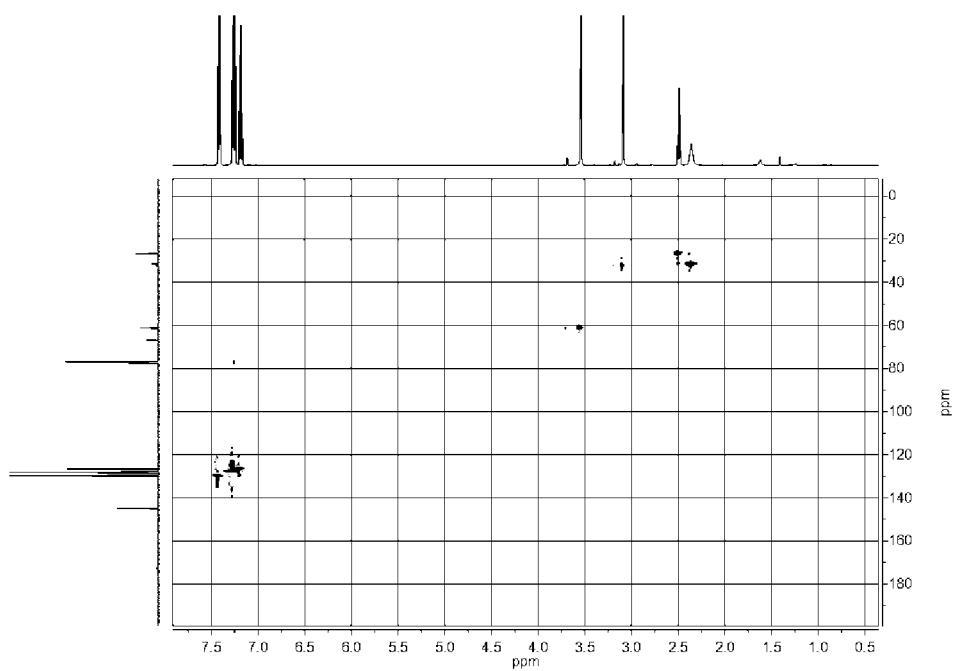
^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3)



^1H - ^1H -COSY-Spektrum (500 MHz, CDCl_3):

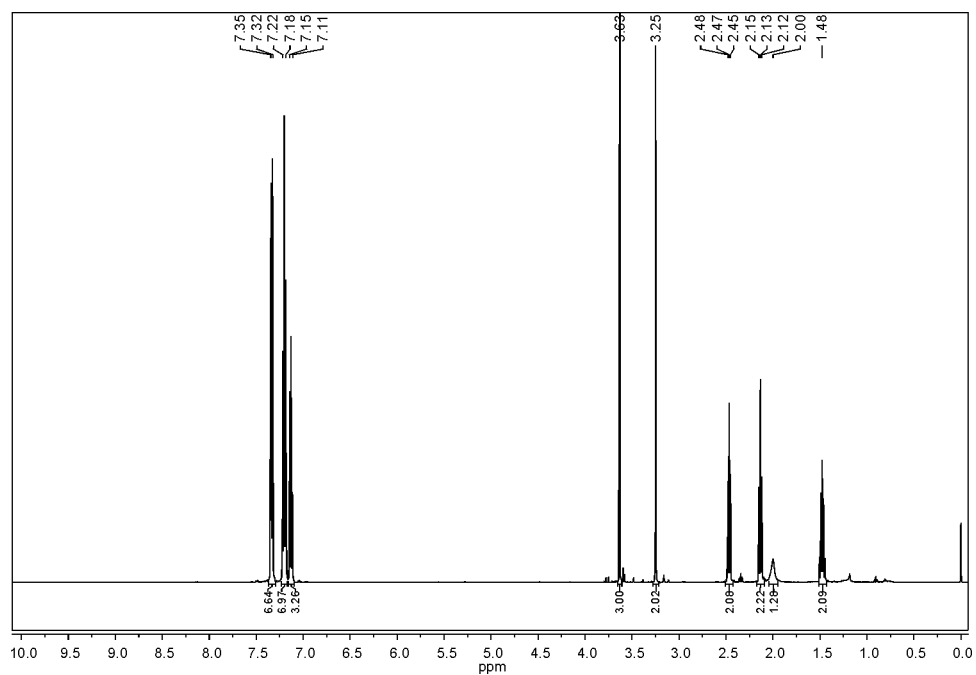


HSQC (500/125 MHz, CDCl_3):

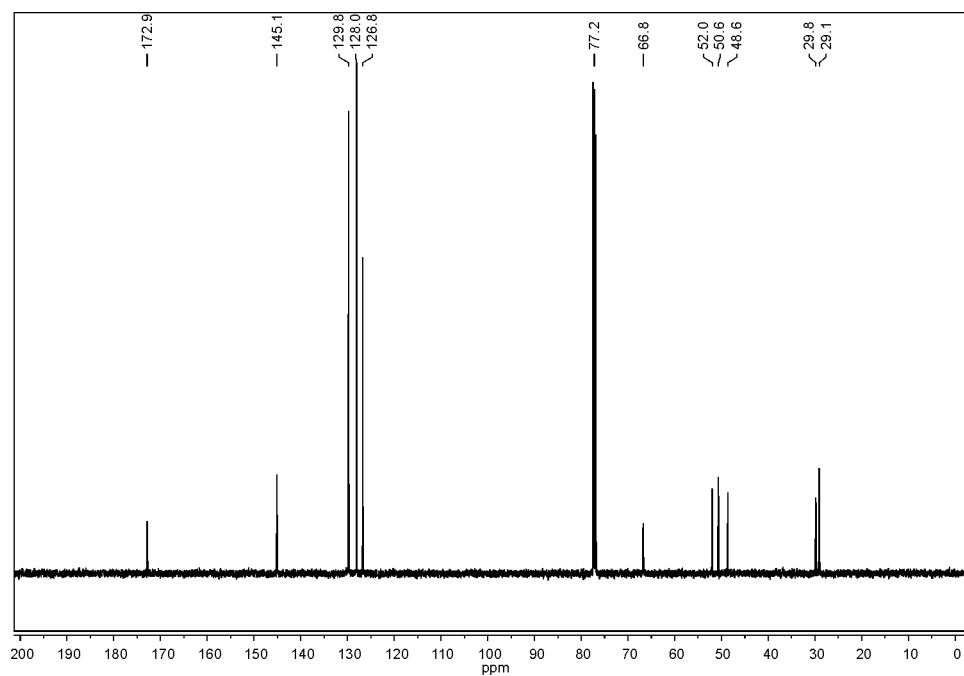


S-Triethylthiopropyl-aminoglycinmethylester (**27**)

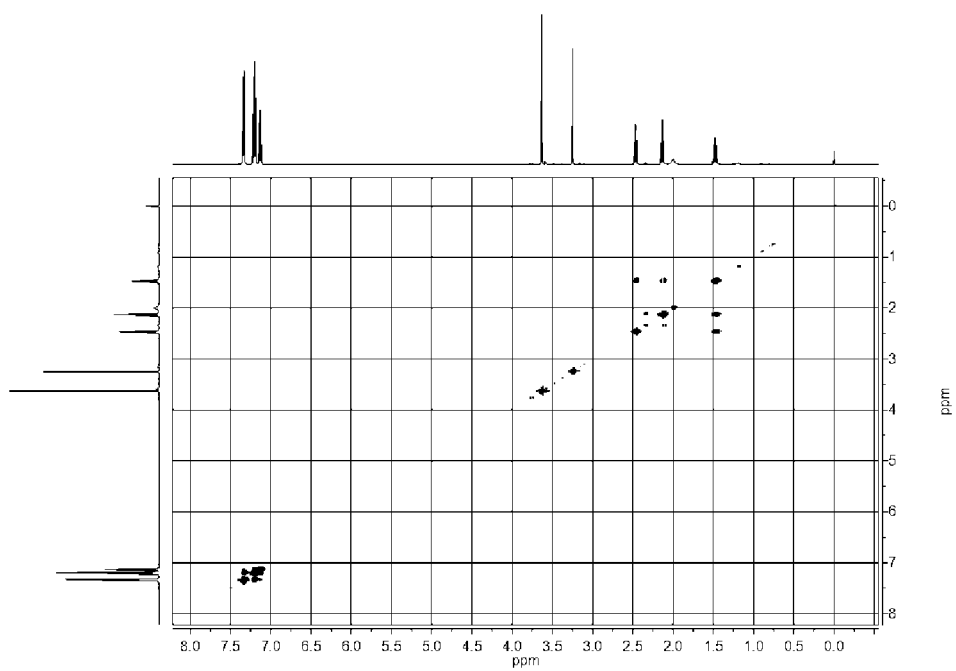
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3):



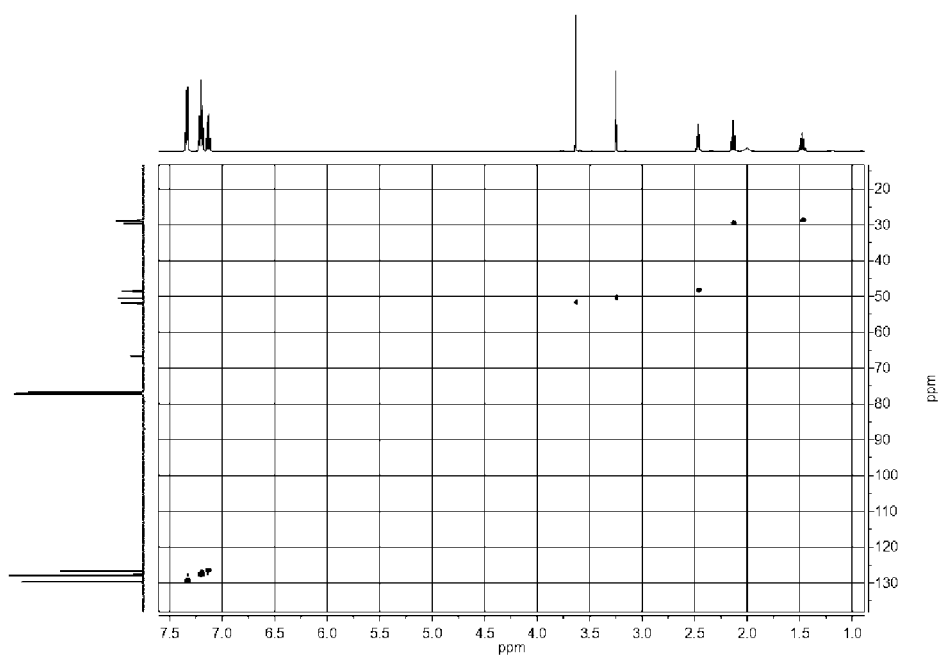
^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3):



^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3):

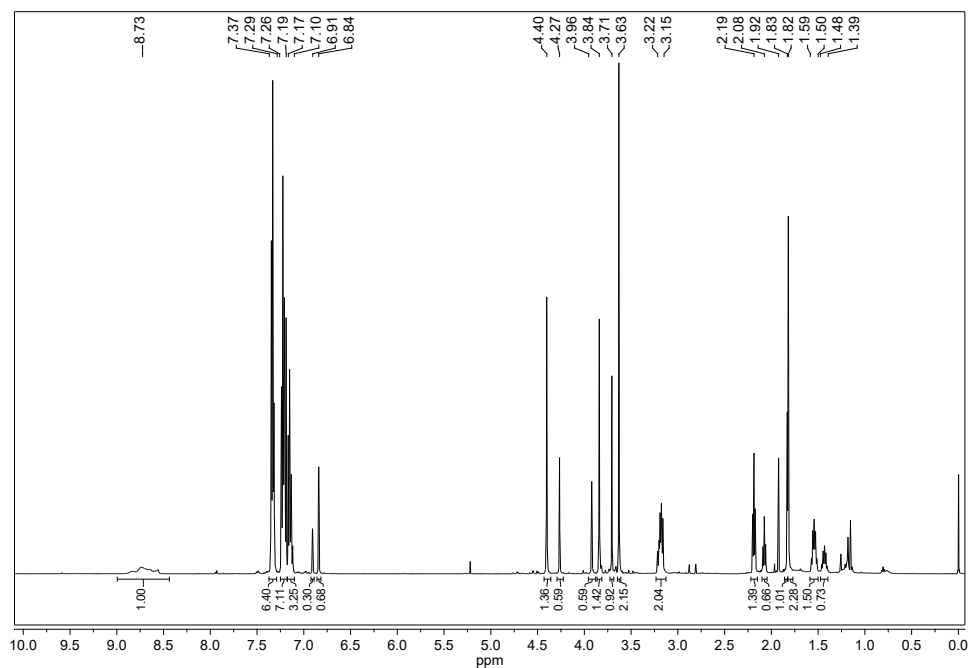


HSQC (500/125 MHz, CDCl_3):

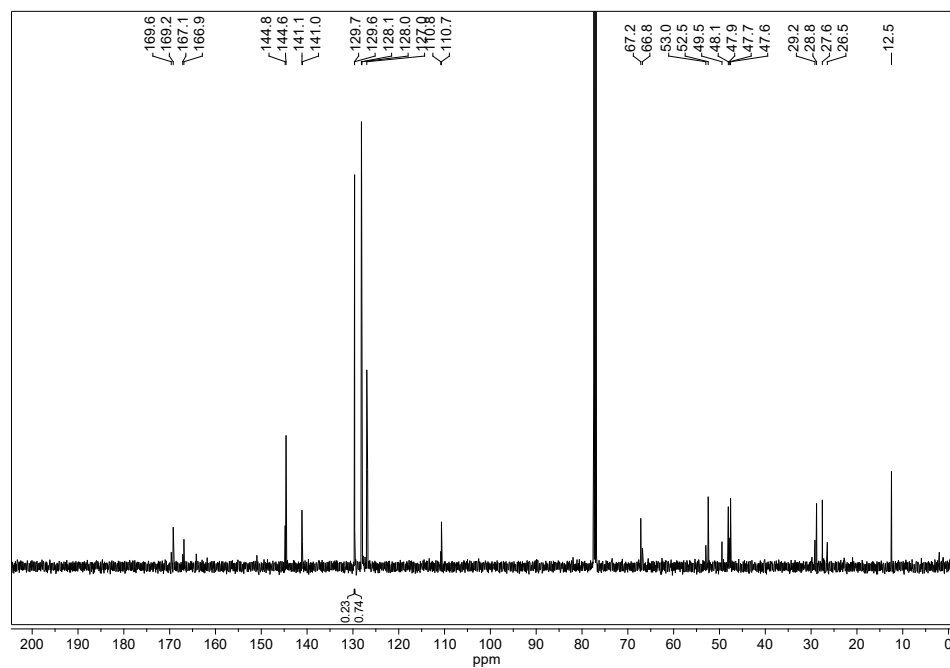


S-Tritylthiopropyl-N-[(1-thyminy)-acetyl]-glycinmethylester (**28**)

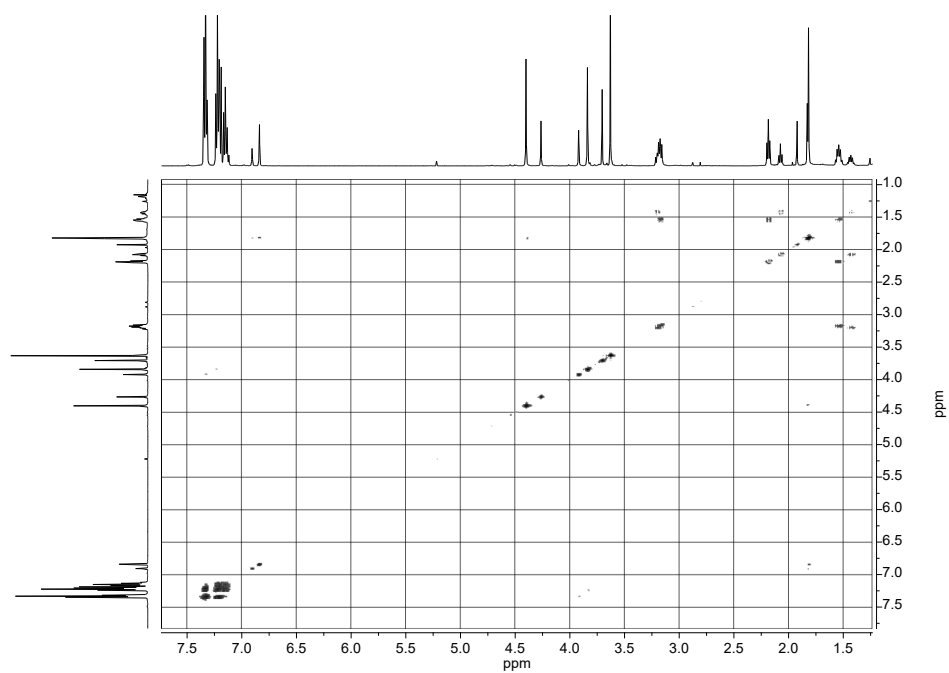
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3):



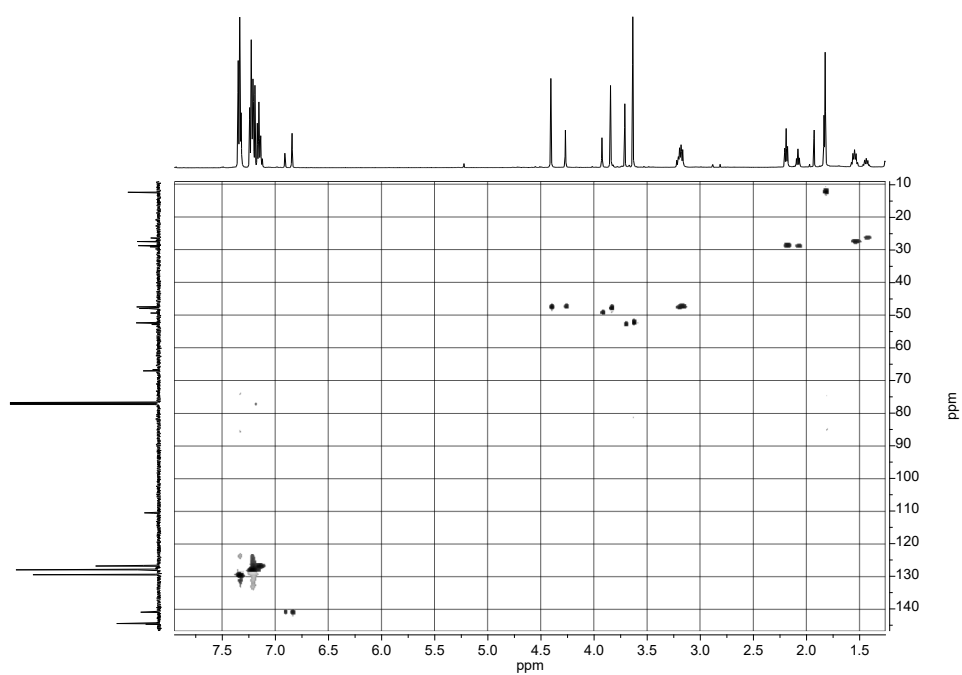
^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3):



^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3):

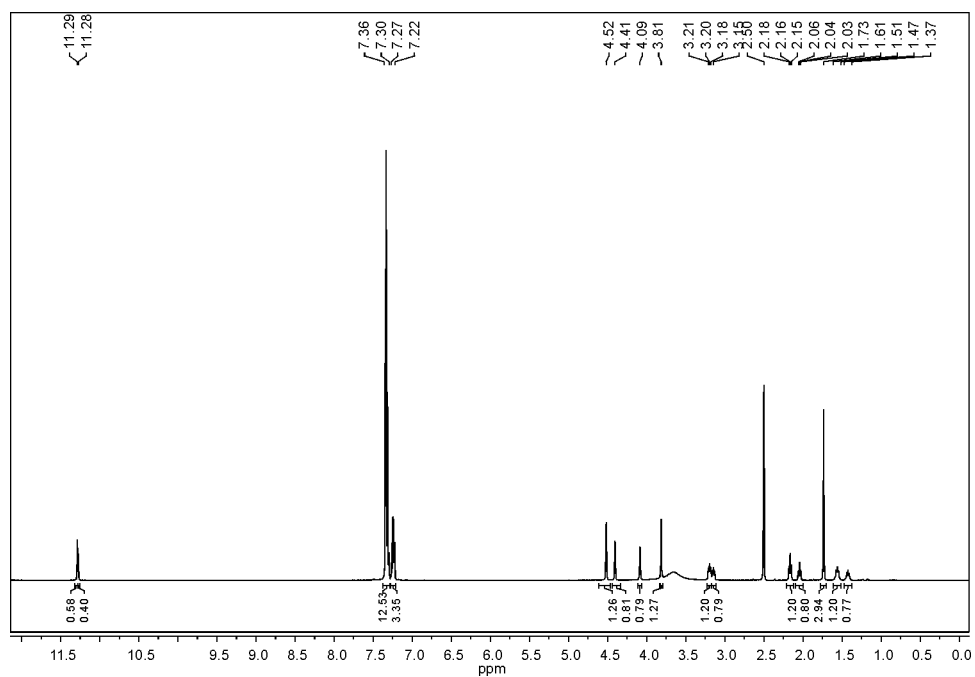


HSQC (500/125 MHz, CDCl_3):

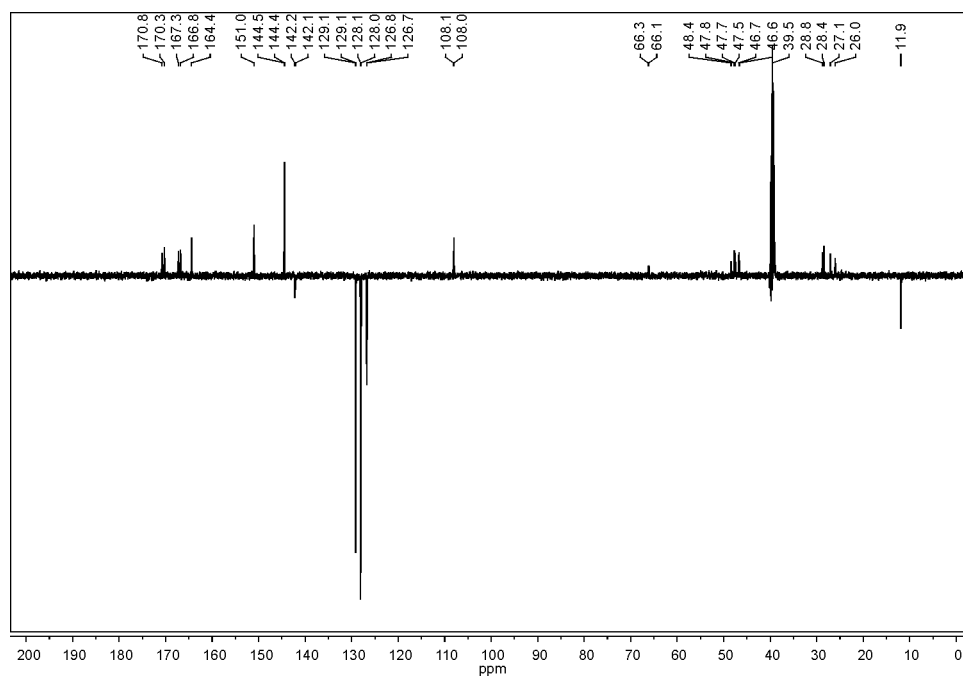


S-Tritylthiopropyl-N-[(1-thyminy)-acetyl]-glycin (**29**):

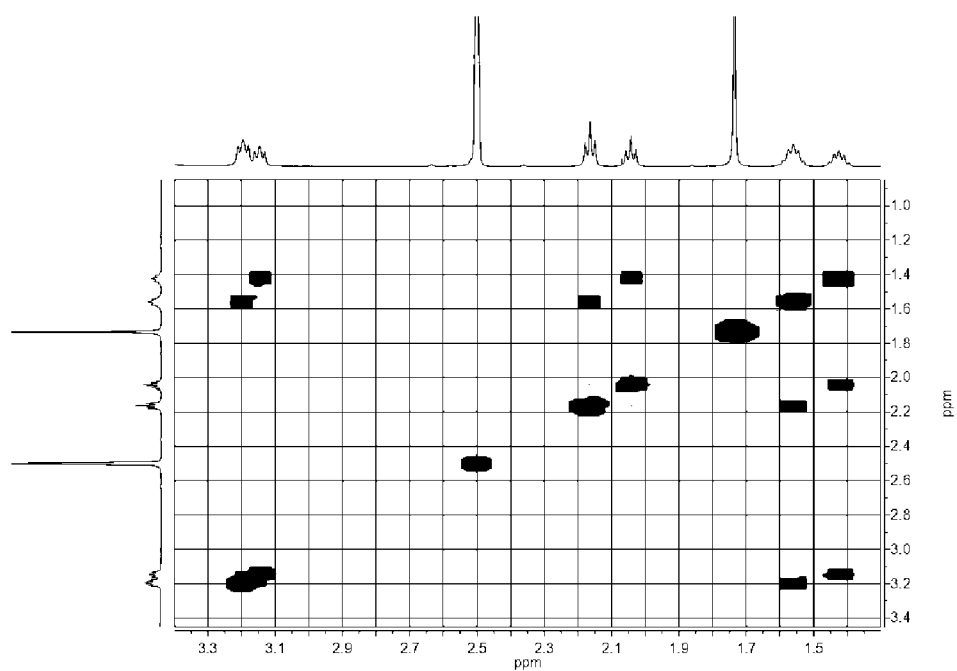
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6):



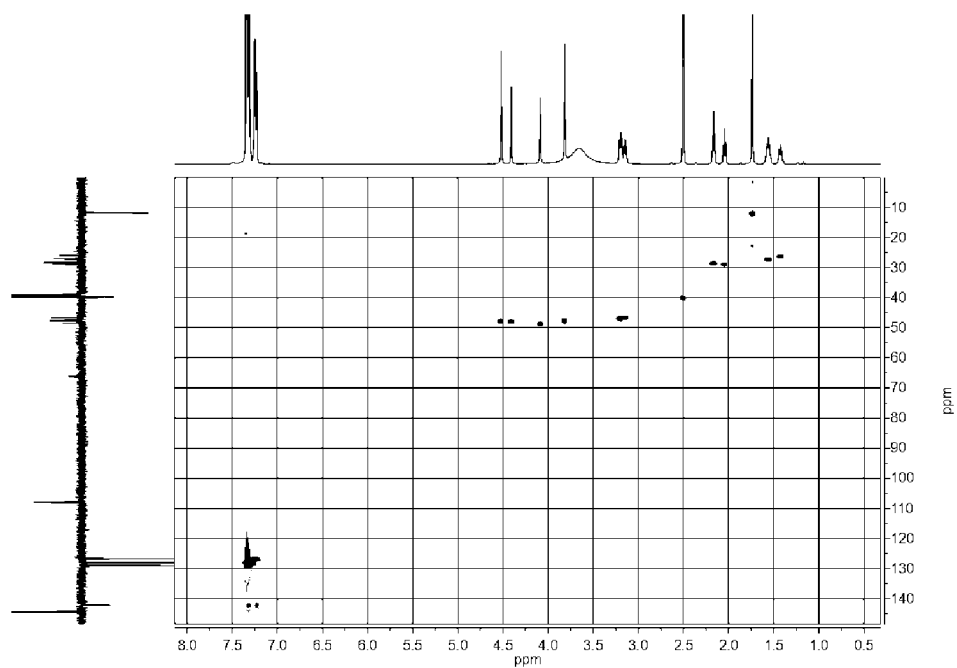
APT-NMR (125 MHz, DMSO-d_6):



^1H - ^1H -COSY (500 MHz, DMSO- d_6):



HSQC (500/125 MHz, DMSO- d_6):



8.3 Abkürzungsverzeichnis

Die Nukleobasen sind bei PNA-Oligomeren mit Kleinbuchstaben und bei DNA-Oligomeren mit Großbuchstaben gekennzeichnet. Aminosäuren werden nach der Ein- oder Dreibuchstabenkodierung angegeben.

Äq	Äquivalent(e)
AS	Adapterstrang
APT	engl. <i>Attached Proton Test</i>
ax	axial
Bambl	<i>Burkholderia ambifaria</i> Lektin
bHA	Bromelain-verdautes Hämagglutinin
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
Boc	<i>tertiär</i> -Butyloxycarbonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-monophospho- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
COSY	Korrelationsspektroskopie (engl. <i>correlation spectroscopy</i>)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DAD	Diodenarray-Detektor
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELLA	Enzym-gekoppelter Lektin-Assay
EPR	Elektronenspinresonanz
eq	äquatorial
ESI	Elektrosprayionisation
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin

Anhang

GalTase	β 1,4-Galactosyltransferase
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HA	Hämagglutinin
HAU	hämagglutinierende Einheit
HAI	Hämagglutination-Inhibition
HCTU	(2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	engl. heteronuclear single quantum coherence
IAV	Influenza A Virus
ⁱPr	<i>iso</i> -Propyl
in silico	computergestützte Methoden
M2	Matrixprotein 2
M	molare Masse
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Man	Mannose
Mmt	Methoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
MST	mikroskalige Thermophorese
NA	Neuraminidase
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PNA	Peptidnukleinsäure

Anhang

RCA	engl. <i>Rolling Circle Amplification</i>
RCA₁₂₀	Ricinus-communis-Agglutinin
RSL	<i>Ralstonia solanacearum</i> Lektin
SFM	engl. <i>scanning force microscopy</i>
SialTase	Sialyltransferase
Sialyl-Lac oder SL	Sialyllactose
Sialyl-LacNAc oder SLN	Sialyl- <i>N</i> -Acetyllactosamin
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TB	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat
TBE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskopie
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Triphenylmethyl, Trityl
UDP-Gal	Uridin-5'-diphosphat- α -D-galactose
UPLC	engl. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vis	sichtbarer Wellenlängenbereich
VS	Versteiferstrang
WGA	Weizenkeimagglutinin

Danksagung

Zuallererst geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Oliver Seitz für sein Vertrauen und die Möglichkeit diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Unser stetiger wissenschaftlicher Austausch war mir ein Kompass und Quelle der Inspiration und über den Rahmen dieser Arbeit hinaus prägend.

Als Stipendiant des Sonderforschungsbereichs 765 – Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip: Neue Architekturen, Funktionen und Anwendungen – möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken. Darüber hinaus boten mir die Teilnahmen am angegliederten Graduiertenkolleg, Symposien und Workshops viele Möglichkeiten mit jungen und erfahrenen Wissenschaftlern ins Gespräch zu kommen, welches einen gewinnbringenden Einfluss auf die Entwicklung dieses Forschungsvorhabens ausübte. In diesem Zusammenhang danke ich meinen Kooperationspartnern Dr. Daniel Lauster, Malte Hilsch (beide AK Prof. Dr. Andreas Herrmann), Dr. Susanne Liese (AK Prof. Dr. Roland Netz), Dr. Kai Ludwig (AK Dr. Christoph Böttcher) und Valentin Reiter-Scherer (AK Prof. Dr. Jürgen P. Rabe) für eine fruchtbare Zusammenarbeit die stets geprägt war von einem freundlich-produktiven Miteinander.

Einen herzlichen Dank möchte ich meinen Laborkollegen und dem gesamten Arbeitskreis aussprechen. Der kollegiale Zusammenhalt und die positive Arbeitsatmosphäre habe ich in der täglichen Arbeit und darüber hinaus als motivierend und aufmunternd empfunden. Für die Durchsicht dieser Arbeit bedanke ich mich bei Gunnar Bachem und Richard Houska. Des Weiteren stellte die Betreuung von Forschungsstudenten, Praktikanten und Auszubildenden eine Bereicherung meines Arbeitsalltags dar. Für deren tatkräftige Unterstützung möchte ich mich sehr bedanken.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie für den bedingungslosen Rückhalt und Liebe.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Victor Bandlow, dass ich die Arbeit eigenständig durchgeführt und die Dissertationsschrift dazu selbstständig verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel und Quellen, die nicht in der Arbeit genannt sind, verwendet.

.....

Ort, Datum

Unterschrift